

Université de Montréal

Étude du rôle pathogénique des auto-anticorps dans la sclérose systémique

par

Jill Hénault

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Docteur

en biologie moléculaire

Mai 2007

© J Hénault, 2007



QH

506

U54

2007

V.022

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle pathogénique des auto-anticorps dans la sclérose systémique

présentée par :

Jill Hénault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur

Yves Raymond, directeur de recherche

Jean-Luc Senécal, codirecteur

Réjean Lapointe, membre du jury

Simon Carette, examinateur externe

Daniel Lajeunesse, représentant du doyen de la FES

Résumé

La sclérose systémique (Scl), ou sclérodermie, est une maladie autoimmune systémique dont l'étiologie et la physiopathologie sont encore inconnues. Cette maladie est caractérisée par une production excessive et dérégulée de matrice extracellulaire par les fibroblastes résultant en une fibrose de la peau et de plusieurs organes. La présence d'auto-anticorps est un des aspects centraux de la Scl, ceux-ci étant détectés chez plus de 90 % des patients. Plusieurs de ces auto-anticorps sont hautement spécifiques à la maladie et sont étroitement associés à différentes formes de la Scl ainsi qu'à des combinaisons particulières de manifestations cliniques.

Bien que la valeur des auto-anticorps comme outils diagnostiques et pronostiques dans la Scl soit maintenant fermement établie, leur implication dans la pathogénèse de la maladie reste un sujet de controverse. Nous avons donc voulu vérifier expérimentalement le rôle pathogénique des auto-anticorps dans la Scl. Pour ce faire, nous avons d'abord examiné la prévalence d'auto-anticorps anti-fibroblastes (AFA) chez les patients atteints de Scl ainsi que les corrélations entre les AFA et les anticorps anti-nucléaires (ANA) spécifiques à la maladie. Une forte corrélation a été observée entre la présence d'AFA et d'ANA anti-ADN topoisomérase I (anti-topo I) chez les patients et nous avons démontré que les anti-topo I eux-mêmes pouvaient lier la surface des fibroblastes de façon spécifique.

Par la suite, nous avons démontré que la cible antigénique des anti-topo I à la surface des fibroblastes était la topo I elle-même, libérée par des cellules endommagées ou en

apoptose. Finalement, il a été déterminé que la formation de complexes topo I/anti-topo I à la surface des fibroblastes était nécessaire et suffisante pour causer le recrutement et l'activation de cellules monocytaires.

En résumé, les résultats de notre étude démontrent pour la première fois le potentiel pathogénique des anti-topo I, un auto-anticorps spécifique à la Scl et associé à la forme la plus sévère de la maladie.

Mots-clés : sclérose systémique, auto-anticorps, anti-topo I, topo I, fibroblastes, fibrose, apoptose.

Abstract

Systemic sclerosis (SSc), or scleroderma, is a systemic autoimmune disorder with still unknown etiology and physiopathology. This disease is characterized by an excessive and deregulated production of extracellular matrix by the fibroblasts resulting in fibrosis in the skin and various internal organs. The presence of autoantibodies is a central feature of SSc as they are detected in more than 95 % of patients. Many of these autoantibodies are highly specific to the disease and are closely associated with different forms of SSc as well as with particular combinations of clinical manifestations.

Although the autoantibodies are now widely recognized as invaluable diagnostic and prognostic tools in SSc, their implication in the pathogenesis of the disease is still controversial. We therefore sought to verify experimentally the pathogenic role of the autoantibodies in SSc. To this end, we first examined the prevalence of anti-fibroblasts antibodies (AFAs) in patients with SSc, and the possible correlation between AFAs and anti-nuclear antibodies (ANAs) specific to the disease. A strong correlation was observed between the presence of AFAs and the ANA anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I) in SSc patients and we demonstrated that anti-topo I themselves could bind to the surface of fibroblasts in a specific manner.

We then demonstrated that the antigenic target of anti-topo I on fibroblast surfaces was topo I itself, released from damaged or apoptotic cells. Finally, we determined

that the binding of topo I/anti-topo I complexes on fibroblast surfaces was necessary and sufficient to recruit and activate monocytic cells.

In summary, the results of our study demonstrate for the first time the pathogenic potential of anti-topo I, an autoantibody specific to SSc and associated with the more severe form of the disease.

Keywords: systemic sclerosis, autoantibody, anti-topo I, topo I, fibroblast, fibrosis, apoptosis.

Table des matières

INTRODUCTION	4
1. SYSTÈME IMMUNITAIRE, TOLÉRANCE ET MALADIES AUTO-IMMUNES	4
2. SCLÉROSE SYSTÉMIQUE/SCLÉRODERMIE.....	9
2.1. FORMES DE LA MALADIE	10
2.2. ÉPIDÉMIOLOGIE ET DÉMOGRAPHIE	14
2.3. GÉNÉTIQUE	15
2.4. MICROCHIMÉRISME.....	18
3. AUTO-ANTICORPS ET SCLÉROSE SYSTÉMIQUE	18
3.1. ANA SPÉCIFIQUES À LA SCLÉROSE SYSTÉMIQUE.....	19
3.1.1. <i>Anticorps anti-ADN-topoisomérase I</i>	20
3.1.2. <i>Anticorps anti-centromère</i>	22
3.1.3. <i>Anticorps anti-ARN polymérase</i>	25
3.1.4. <i>Les anti-Th/To</i>	26
3.2. ANA NON SPÉCIFIQUES À LA SCLÉROSE SYSTÉMIQUE	27
3.2.1. <i>Les anti-PM/Scl</i>	28
3.2.2. <i>Les anti-fibrillarine (anti-U3 RNP)</i>	29
3.2.3. <i>Les anti-U1-RNP, anti-B23 et anti-hUBF (NOR-90)</i>	30
3.3. AUTRES AUTO-ANTICORPS DANS LA SCLÉROSE SYSTÉMIQUE	31
3.3.1. <i>Les anti-cellules endothéliales (AECA)</i>	32
3.3.2. <i>Les anti-fibroblastes (AFA)</i>	33
3.3.3. <i>Les anti-Ku</i>	33
3.3.4. <i>Les anti-fibrilline-1</i>	33
3.3.5. <i>Les anti-collagènes</i>	34
3.4. ORIGINE	34
4. MORT CELLULAIRE ET AUTO-ANTIGÈNES BIFONCTIONNELS	37
4.1. APOPTOSE VS NÉCROSE CELLULAIRE.....	38
4.2. AUTO-ANTIGÈNES BIFONCTIONNELS	40
5. PATHOPHYSIOLOGIE DE LA SCL	42
5.1. CELLULES ENDOTHÉLIALES.....	43
5.2. CELLULES MONONUCLÉÉES.....	45
5.3. FIBROBLASTES	49
6. RÔLE DES AUTO-ANTICORPS DANS LA PATHOPHYSIOLOGIE DE LA SCL.....	54

6.1. OUTILS DIAGNOSTIQUES ET PRONOSTIQUES	54
6.2. AGENTS PATHOGÈNES.....	55
RÉSULTATS	61
OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE LA THÈSE.....	62
ARTICLE #1: LIAISON DIRECTE DES AUTO-ANTICORPS ANTI-TOPOISOMÉRASE I À LA SURFACE DES FIBROBLASTES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SCLÉROSE SYSTÉMIQUE.	63
<i>Présentation de l'article #1:</i>	<i>64</i>
<i>Contribution des auteurs à l'article #1:.....</i>	<i>65</i>
ARTICLE #2: LA LIAISON DE LA TOPOISOMÉRASE I A LA SURFACE DES FIBROBLASTES INDUIT L'ADÉSION ET L'ACTIVATION DE CELLULES MONOCYTAIRES EN PRÉSENCE D'AUTO-ANTICORPS ANTI-TOPO I PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SCLÉROSE SYSTÉMIQUE.	96
<i>Présentation de l'article #2:</i>	<i>97</i>
<i>Contribution des auteurs à l'article 2:.....</i>	<i>97</i>
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	134
RÔLE PATHOGÉNIQUE DES ANTI-TOPO I DANS LA SCL.....	134
VÉRIFICATION DE LA PATHOGÉNÉCITÉ DES ANTI-TOPO I <i>IN VIVO</i>	140
LA TOPO I À LA SURFACE DES FIBROBLASTES.....	144
LA CIBLE DE LA TOPO I À LA SURFACE DES FIBROBLASTES.....	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	150
BIBLIOGRAPHIE	152
ANNEXE I: RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE #2.	XVIII
ANNEXE II: RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	XXIII

Liste des tableaux

Tableau I	Critères diagnostiques de la sclérose systémique	11
Tableau II	Critères de classification des sclérodermies systémiques limitées	11
Tableau III	ANA majeurs détectés dans la sclérose systémique	19
Tableau IV	Mécanismes d'apparition des auto-anticorps dans la Scl	35
Tableau V	Auto-antigènes chimiotactiques pour les Dc immatures.....	41
Tableau VI	Arguments majeurs en faveur d'un rôle potentiel des ANA dans la pathogénèse de la Scl	56

Liste des figures

Figure 1	Exemples de patron d'immunofluorescence indirecte d'anti-topo I sur des fibroblastes humains22
Figure 2	Exemples de patron d'immunofluorescence indirecte d'AAC sur des fibroblastes humains23
Figure 3	Apoptose vs nécrose cellulaire39
Figure 4	Résumé de la pathogénèse de la sclérose systémique43
Figure 5	Modèle de la pathogénèse de la sclérose systémique53
Figure 6	Hypothèse du rôle pathogénique des anti-topo I dans la Scl137
Figure 7	Hypothèse de l'amplification des réponses pro-inflammatoire et pro-fibrotique chez les patients sclérodermique avec anti-topo I139

Annexes

Figure A1	Étude par immunofluorescence indirecte du patron de liaison de la topo I à la surface des fibroblastes normaux et de patients sclérodermiquesxix
Figure A2	Induction de l'apoptose chez les HUVEC par déplétion de sérum ...xxi
Figure A3	Localisation par immunofluorescence indirecte de la topo I dans les cellules endothéliales lors du processus d'apoptosexxiv
Figure A4	Étude par biopuce à protéines des cytokines exprimées par les monocytes en co-culture avec des fibroblastes exposés à de la topo I en présence d'anti-topo Ixxvii

Figure A5	Étude par microscopie confocale de la liaison de la topo I sur les fibroblastes	xxx
Figure A6	Étude par microscopie confocale du patron de liaison de la topo I à la surface des fibroblastes.	xxxi
Figure A7	Étude par cytométrie en flux de l'effet de la méthyl-beta-cyclodextrine (M β C) sur la liaison de la topo I à la surface des fibroblastes.....	xxxii

Liste des abréviations

aa	acide aminé
AAC	anticorps anti-centromère
AANo	anticorps anti-nucléolaire
ACR	« American College of Rheumatology »
AECA	anticorps anti-cellule endothéliale
AFA	anticorps anti-fibroblaste
ANA	anticorps anti-nucléaire
Anti-ARNP	anticorps anti-ARN polymérase
Anti-topo I	anticorps anti-ADN topoisomérase I
APC	cellules présentatrices d'antigène
APECED	« Auto-immune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy »
AR	arthrite rhumatoïde
BAL	lavage bronchoalvéolaire
CENP	protéine centromérique
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CREST	calcifications, phénomène de Raynaud, atteinte oesophagienne, sclérodactylie, télangiectasies
DC	cellule dendritique
DLco	diffusion du monoxyde de carbone
dScl	sclérodermie diffuse

ELISA	« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »
GVHDmod	« Graft-vs-Host disease » modifié
Hep-2	« Human Epithelioma Pharynx N°2 »
HMVEC	« Human Microvascular Endothelial Cell »
HUVEC	« Human Umbilical Vein Endothelial Cell »
IPEX	« Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome »
LB	lymphocyte B
lScl	sclérodémie limitée
LT	lymphocyte T
mARN	ARN messenger
MβC	methyl-beta-cyclodextrine
MCTD	maladie mixte du tissu conjonctif
MEC	matrice extra-cellulaire
NHDF	« Normal Human Dermal Fibroblast »
NHLF	« Normal Human Lung Fibroblast »
NK	« Natural Killer »
PM	polymyosite
PR	Phénomène de Raynaud
RE	réticulum endoplasmique
SCCS	« American Rheumatism Association's Scleroderma Criteria Cooperative Study »
Scl	sclérodémie

SLE	lupus systémique érythémateux
SSc	« Systemic Sclerosis »
TCR	récepteur de lymphocyte T
Topo I	ADN topoisomérase I
Treg	lymphocyte T régulateur
Tsk	souris «Tight Skin»

À Ariane et Jacques Moisan, mes deux soleils

Remerciements

La thèse de doctorat présentée ici est l'aboutissement de plusieurs années de labeur pendant lesquelles j'ai eu la chance et l'extrême bonheur de côtoyer des personnes exceptionnelles qui m'ont guidée et soutenue sans relâche. J'aimerais maintenant leur témoigner toute ma gratitude.

Je tiens d'abord à remercier les docteurs Yves Raymond et Jean-Luc Senécal, professeurs titulaires au département de médecine de l'Université de Montréal, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, au sein de leur équipe de recherche et pour m'avoir transmis le savoir et la passion nécessaires à l'accomplissement de mes études doctorales. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour leur constant soutien et leurs judicieux conseils.

J'aimerais ensuite exprimer ma gratitude à mes collègues de laboratoire, passés et présents.

À Isabelle Cément, pour son support technique et sa participation directe à mon projet de recherche, mais surtout pour sa débordante générosité, son grand coeur et son sourire de tous les jours.

À Mélanie Tremblay, pour sa participation directe à mon projet de recherche, sa patience et sa détermination, mais surtout pour une certaine expérience qui a changé ma vie.

À Mélanie Dieudé, pour ses bons conseils et sa sagesse de «doyenne».

À Marie-Soleil Christin-Piché et Geneviève Robitaille, pour leur complicité et leur amitié sincère. Votre support moral infailible m'a permis de retenir un peu de ma santé mentale... les filles.

À Monique Bernard, pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son sens critique impitoyable.

À Julie Arcand, pour sa gentillesse et tous les actes vampiriques qu'elle a commis en mon nom.

Finalement, à Martin Paradis et Martial Koenig, rares représentants de la gent masculine dans notre laboratoire, pour leur bonne humeur et leur amabilité.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux docteurs Marie-Josée Hébert et Nathalie Lamarche, pour l'intérêt qu'elles ont manifesté envers mon projet de recherche et leurs encouragements à poursuivre ma formation académique.

J'aimerais témoigner ma reconnaissance aux membres de la Société Sclérodémie Québec, pour leurs généreuses donations et leur détermination à stimuler la recherche dédiée à la sclérodémie, ainsi qu'aux Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), pour leur financement.

Je désire enfin remercier de tout coeur les membres de ma famille. Mon père et ma mère, Marc et Suzanne Hénault, qui m'ont toujours encouragée à poursuivre mes rêves. Papa, maman, je ne pourrai jamais assez vous remercier.

À Jacques Moisan, mon mari, mon ami, mon tout, grâce à qui tout est possible.

À Ariane, mon petit soleil, dont chacun des sourires m'encourage à aller de l'avant.

Avant-propos

Il est de ces maladies rares, dites orphelines, qui, parce qu'elles ne touchent qu'une fraction très restreinte de la population, restent souvent orphelines d'intérêt et de traitement. La sclérose systémique (Scl) est l'une de ces maladies.

D'étiologie inconnue, la Scl touche environ 300 000 personnes aux États-Unis et près de 7 000 au Québec. Cette maladie est caractérisée par un dépôt excessif et désorganisé de collagène dans les tissus, menant à la fibrose et, ultimement, à la perte de la fonction tissulaire. Sa physiopathologie complexe se traduit par un éventail de manifestations cliniques, allant de la simple atteinte cutanée à une fibrose systémique fulgurante. Indépendamment de sa forme, la Scl est chronique, irréversible et incurable.

Quoique relativement limitée, la recherche dédiée à la Scl a permis d'élargir considérablement nos connaissances sur les mécanismes et les médiateurs impliqués dans la pathogénèse de cette maladie. Ces connaissances ont mené à l'émergence de nouvelles thérapies, plus ciblées, qui ont grandement amélioré la gestion de la maladie. Toutefois, bien que les récentes avancées thérapeutiques aient permis de réduire considérablement l'incidence de complications vasculaires fatales associées à la Scl, comme les crises rénales et l'hypertension pulmonaire (1), cette maladie possède encore le taux de mortalité le plus élevé parmi les maladies auto-immunes rhumatismales (2).

Ainsi donc, les besoins en nouvelles thérapies pour traiter la Scl sont criants et l'avènement de meilleures thérapies n'est possible qu'en poursuivant la recherche

actuelle dédiée à cette maladie et, surtout, en explorant de nouvelles avenues de recherche. Le but de l'étude présentée dans cette thèse était justement d'explorer une facette encore très mal connue de la Scl, c'est-à-dire : « Le rôle pathogénique des auto-anticorps dans la Scl ».

Bien que plus de 90 % des patients atteints de Scl possèdent des auto-anticorps spécifiques (3), leur rôle dans la pathogénèse de la maladie est encore sujet à controverse. En effet, ces auto-anticorps ont, pour la plupart, des cibles intranucléaires difficilement accessibles, et leur présence dans les séra de patients est, par conséquent, généralement considérée comme un «symptôme» de la maladie plutôt que comme une «cause». Les données obtenues lors de récentes études bousculent toutefois ce paradigme. Ainsi, il a été démontré que des auto-anticorps présents chez les patients sclérodermiques pouvaient influencer directement l'état d'activation de certaines cellules (4-10). De plus, un nombre croissant d'études font état de corrélations étroites entre les titres sériques d'auto-anticorps chez les patients sclérodermiques et la sévérité et l'activité de la maladie (11-15). Ensemble, ces résultats suggèrent que certains auto-anticorps présents chez les patients sclérodermiques pourraient être impliqués directement dans la pathogénèse de la maladie.

Notre étude avait donc pour but d'examiner la pathogénicité des auto-anticorps dans la Scl. Nos résultats démontrent que des anticorps anti-nucléaires (ANA) spécifiques à la Scl, les anti-DNA topoisomérase I (anti-topo I), peuvent former des complexes topo I/anti-topo I à la surface des fibroblastes et induire le recrutement et l'activation de cellules monocytaires (voir section **Résultats**). Ces résultats démontrent, pour la

première fois, que des ANA de patients sclérodermiques peuvent, dans certaines circonstances, agir comme agents pathogènes.

La section **Résultats** de cette thèse est précédée par une section **Introduction**, dans laquelle je m'applique à faire le résumé de la littérature pertinente à notre étude. Cette section inclut également les données présentes dans la littérature qui nous ont amenés à nous questionner sur le rôle des auto-anticorps dans la Scl.

Dans la section **Discussion générale**, je fais un retour sur l'ensemble des résultats obtenus durant notre étude et je les situe dans le contexte de la littérature concernant la Scl et les sujets connexes.

Finalement, je conclus ma thèse en résumant les contributions apportées par notre étude au domaine de la recherche sur la Scl et en présentant les perspectives d'avenir de la recherche dans ce domaine. Sur ce, je vous souhaite une bonne lecture.

Introduction

1. Système immunitaire, tolérance et maladies auto-immunes

Le système immunitaire est notre sixième sens. Il est la main biologique qui palpe tous les recoins de notre organisme, à l'affût de l'envahisseur, intrinsèque ou étranger.

L'immunité naturelle, ou innée, nous sert de première ligne de défense. Elle est constituée de cellules et de molécules spécialisées et non-spécifiques qui répondent rapidement à des stimuli qui sont restés constants tout au long de l'évolution. L'immunité acquise, pour sa part, est constituée de cellules et molécules hautement spécifiques qui requièrent une adaptation antigénique pour être efficaces. Bien que plus lente que la réponse innée, la réponse immunitaire acquise a l'avantage de cibler spécifiquement un pathogène et de générer une mémoire immunitaire.

L'efficacité de notre système immunitaire à gérer l'intrusion d'agents pathogènes repose sur la discrimination entre «le soi», c'est-à-dire les constituants propres à notre organisme et qui participent à son bon fonctionnement, et le «non-soi», c'est-à-dire toutes les autres molécules externes au soi. Les cellules responsables de la discrimination entre les antigènes du soi (ou auto-antigènes) et du non-soi sont les lymphocytes B (LB) et T (LT). Ces cellules arborent des récepteurs, les récepteurs des LB (BCR) et les récepteurs des LT (TCR), capables de reconnaître de façon spécifique un répertoire d'antigènes quasi infini. La reconnaissance d'un antigène externe au soi par les LB et LT dans un contexte propice à l'inflammation induit leur expansion clonale et leur migration vers les tissus. Une fois dans les tissus, ces

cellules attaquent, directement ou indirectement, la source antigénique jusqu'à son éradication complète. Une fois l'antigène disparu, la majorité des LB et LT activés entre en apoptose et l'inflammation se résorbe. Si la discrimination entre les antigènes du soi et du non-soi ne se fait pas correctement, les cellules immunitaires attaquent nos propres tissus: c'est l'auto-immunité.

De 20 à 50 % des lymphocytes immatures expriment des BCR ou TCR ayant une très grande affinité pour un auto-antigène (16-18). Pour contrôler cette sous-population de cellules potentiellement auto-réactives, le système immunitaire emploie cinq stratégies visant à limiter leurs chances d'activation. La première, décrite par F.M. Burnet en 1960, consiste à éliminer par «sélection négative» les lymphocytes immatures auto-réactifs dans le thymus ou la moëlle osseuse. La seconde consiste à permettre à un lymphocyte immature d'«éditer» son récepteur, par recombinaison V(D) J ou hypermutation somatique, de façon à lui faire perdre son affinité pour le soi (19). La troisième consiste à rendre les lymphocytes auto-réactifs anergiques, c'est-à-dire réfractaires à l'activation. L'anergie est induite par des signaux biochimiques intrinsèques au lymphocyte périphérique lorsque ce dernier rencontre son antigène en l'absence de co-stimulation (20;21). Un lymphocyte auto-réactif ayant échappé aux trois mécanismes mentionnés plus haut pourra encore être activement contrôlé par une population de LT dite «régulatrice» (Treg) (22). Finalement, le système immunitaire dispose d'un ensemble de mécanismes limitant l'accès des auto-antigènes aux lymphocytes auto-réactifs, maintenant ces derniers dans un state d'«ignorance». Parmi ces mécanismes, on compte l'apoptose, la phagocytose de cellules apoptotiques et la séquestration d'auto-antigènes dans des

sites dit «privilégiés», auxquels les lymphocytes en circulation n'ont normalement pas accès.

Mises ensemble, ces cinq stratégies permettent d'induire un état de «tolérance» vis-à-vis des antigènes du soi.

Il demeure néanmoins qu'un individu normal et en santé possède des LT auto-réactifs ainsi que des LB capables de produire des auto-anticorps (23;24). L'auto-immunité est naturelle et physiologique. Elle devient pathologique lorsque le nombre et l'avidité des cellules auto-réactives s'accroissent et entraînent un bris de la tolérance au soi: c'est la maladie auto-immune.

Près d'une cinquantaine de maladies auto-immunes ont été décrites à ce jour et on estime que de 3 à 8 % de la population nord-américaine souffre d'une ou plusieurs de ces maladies (25). Comment expliquer cette situation ? Quelles sont les circonstances menant au bris de la tolérance envers le soi ?

La cause directe de la grande majorité des maladies auto-immunes est encore inconnue. Ces maladies sont généralement considérées comme étant le résultat d'une combinaison complexe de facteurs génétiques et environnementaux.

Il existe néanmoins des exemples de maladies auto-immunes monogéniques découlant de mutations ponctuelles dans un gène directement impliqué dans la régulation de la tolérance au soi. Parmi ces maladies, on retrouve le syndrome APECED (Auto-immune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy), ou polyendocrinopathie autoimmune de type I et le syndrome d'IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome). La première est due à des mutations dans le gène AIRE (26). Ce gène régule la présentation

d'auto-antigènes dans le thymus, processus essentiel à la sélection négative des LT auto-réactifs (27;28). Une sélection négative déficiente entraîne une augmentation des LT auto-réactifs en circulation et une augmentation des attaques auto-immunes dans les tissus périphériques (29). Pour sa part, l'IPEX est causée par des mutations dans le gène FOXP3 (30), gène impliqué dans la maturation des Treg (31). Chez les patients souffrant de l'IPEX, les Treg ont une fonction suppressive déficiente, ce qui a pour effet de permettre la prolifération d'un plus grand nombre de lymphocytes auto-réactifs (32).

Cependant, la grande majorité des maladies auto-immunes est probablement due à une augmentation de la susceptibilité de l'individu résultant de mutations dans plusieurs gènes ou de la présence de combinaisons d'allèles particulières. Chez les modèles animaux transgéniques de maladies auto-immunes, la plupart des gènes associés au développement de l'auto-immunité sont impliqués, directement ou indirectement, dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance au soi.

L'existence d'une prédisposition génétique aux maladies auto-immunes est démontrée par les formes familiales de ces maladies et surtout par la concordance de ces maladies chez les jumeaux monozygotes. Cependant, cette concordance n'est que partielle, ce qui suggère le rôle d'autres facteurs, en particulier l'environnement.

Parmi les facteurs environnementaux associés à des maladies auto-immunes, on retrouve les agents infectieux. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent une association entre certaines infections et le développement de maladies auto-immunes (33). Deux mécanismes ont été avancés pour tenter d'expliquer comment la présence de certaines infections pourrait entraîner une rupture de la tolérance au soi : le

mimétisme moléculaire et la rupture de l'«ignorance». Le mimétisme moléculaire soutient que le déclenchement de l'auto-immunité résulte de la similitude entre un épitope de l'agent infectieux, contre lequel il y a une réponse immunitaire active, et un épitope du soi. Ainsi, une réponse immunitaire enclenchée par un antigène du non-soi dans un contexte pro-inflammatoire dériverait vers une réponse soutenue contre un antigène similaire du soi, résultant en une maladie auto-immune. Il se pourrait également que l'agent infectieux déclenche une réponse auto-immune en brisant l'ignorance des lymphocytes envers un antigène du soi. Il a été proposé qu'une infection dans un organe particulier entraîne la migration de cellules présentatrices d'antigènes (APC) portant des auto-antigènes dans les ganglions lymphatiques périphériques, permettant ainsi aux lymphocytes auto-réactifs de reconnaître leur cible. Ces lymphocytes activés migreraient ensuite vers les tissus de l'organe, causant leur destruction (34-36).

D'autres facteurs environnementaux ont également été associés au développement de certaines maladies auto-immunes, comme par exemple certains solvants, diluants, métaux lourds et médicaments. Cependant, les mécanismes par lesquels ces produits conduisent à la rupture de la tolérance sont encore bien mal connus.

Qu'elles soient le résultat de mutations génétiques ou d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux, les maladies auto-immunes restent un défi de taille pour ceux qui cherchent à mieux les comprendre. Il est néanmoins évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes liés à ces maladies est la clé d'une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire en général.

2. Sclérose systémique/Sclérodermie

« In its aggravated form, diffuse scleroderma is one of the most terrible of all human ills. Like Tithonus to wither slowly and like him to be beaten down and marred and wasted until one is literally a mummy encased in an evershrinking skin of steel is a fate not pictured in any tragedy, ancient or modern ».

Sir W. Osler, «The Principles and Practice of Medicine»

La première description convaincante d'un cas de sclérose systémique (Scl), aussi appelée sclérodermie, a été faite par Curzio de Naples en 1753. La patiente, une jeune fille âgée de dix-sept ans, fût décrite comme ayant un durcissement de la peau sur toute la surface de son corps, des paupières étroites et de la difficulté à ouvrir la bouche. L'établissement de la Scl comme entité clinique ne se fait toutefois qu'en 1847, année où Gintrac révisé plusieurs cas similaires d'une maladie de peau et nomme cette maladie «sclérodermie». La Scl est une maladie d'étiologie inconnue caractérisée par un dépôt anormal de matrice extra-cellulaire (MEC) qui entraîne une fibrose de la peau et des organes internes ainsi que par des phénomènes de dérégulation vasculaire menant à l'hypoxie tissulaire (37). La jeune patiente décrite par Curzio de Naples souffrait probablement de la forme la plus sévère de la maladie. Dans cette forme, la fibrose cutanée peut atteindre toute la surface du corps. La saturation du derme par les dépôts de collagène cause l'atrophie des follicules pileux, des glandes sébacées et sudoripares. La peau s'épaissit, se tend et se durcit, si bien qu'elle finit par entraver la mobilité des muscles, des tendons et des articulations. Au niveau du visage, l'induration de la peau restreint la mobilité des muscles des paupières, des joues et des lèvres, laissant le patient «sans expression» et avec de

grandes difficultés à ouvrir et à fermer la bouche. Les mains sont généralement très touchées, montrant des changements associés à la sclérodactylie : peau tendue et luisante, hyperpigmentation, présence d'ulcères et de nécrose tissulaire aux extrémités des doigts, déformations articulaires et contractures en flexion au niveau des jointures. La sclérose peut également toucher un ou plusieurs organes internes, généralement les poumons, les reins, le cœur et l'appareil digestif, causant une perte de fonction pouvant aller jusqu'à la défaillance totale de l'organe.

Dans sa forme la plus sévère, la Scl est véritablement la maladie qui momifie.

2.1. Formes de la maladie

La Scl peut se présenter sous des formes extrêmement variables, allant d'une simple atteinte cutanée locale à la forme la plus sévère, dite systémique, où non seulement la peau, mais un ou plusieurs organes internes sont atteints. Il y a également des cas où certains organes sont atteints sans présence de fibrose cutanée. Le vaste éventail de symptômes pouvant être reliés à la Scl en fait une maladie souvent difficile à diagnostiquer. Pour faciliter le diagnostic et la classification des différentes formes de cette maladie, une liste de critères basée sur des observations cliniques et de laboratoire est soumise pour la première fois en 1980 (Tableau I) et fait suite à une étude multicentrique, la SCCS (American Rheumatism Association's Scleroderma Criteria Cooperative Study) regroupant 264 patients atteints de Scl (38). Ces critères, révisés par LeRoy en 2001 (39) (Tableau II), sont maintenant officiellement reconnus par l'ACR (American College of Rheumatology) et permettent de diagnostiquer près de 97 % des cas de Scl.

Tableau I. Critères diagnostiques de la sclérose systémique (SCCS, 1980) ^{a, b}

Critère majeur : Sclérose cutanée proximale (modification sclérodermique de la peau qui est tendue, épaissie, indurée, touchant la face, le cou, le tronc ou la partie proximale des membres supérieurs ou inférieurs).

Critères mineurs :

- Sclérodactylie
- Cicatrice déprimée d'un bout de doigt
- Ulcérations de l'extrémité d'un doigt
- Fibrose pulmonaire des bases

^a Un critère majeur ou au moins 2 critères mineurs sont nécessaires pour affirmer le diagnostic.

^b Si le critère majeur est présent, on parle de ScS diffuse. Si seuls deux critères mineurs sont présents, on parlera de ScS limitée.

Tableau II. Critères de classification des sclérodermies systémiques limitées (LeRoy, 2001)

Sclérodermie systémique limitée :

Phénomène de Raynaud (PR) documenté objectivement par l'examen clinique, le test au froid ou le test Nielsen ou équivalent

plus

- soit une anomalie capillaroscopique (dilatation capillaire et/ou zone avasculaire)
- soit présence d'anticorps spécifiques de la sclérodermie systémique (anti-centromère, anti-ADN-topoisomérase I, anti-fibrillarine, anti-PM-Scl, anti-fibrilline ou anti-ARN polymérase I/III à un titre $\geq 1:100$)

Sclérodermie systémique cutanée limitée :

En plus des critères précédents, les patients ont une infiltration cutanée distale en aval des coudes et des genoux (l'épaississement de la peau peut toucher les doigts, les mains, les avant-bras, les pieds, les orteils, le cou et la face en l'absence d'infiltration cutanée des bras, du thorax, de l'abdomen, du dos et des cuisses).

Le CREST (calcifications, phénomène de Raynaud, atteinte oesophagienne, sclérodactylie, télangiectasies) correspond à une forme particulière de ScS limitée.

Ainsi, deux formes de Scl sont reconnues : la forme diffuse (dScl) et la forme limitée (lScl) (40). La forme diffuse, plus sévère, est caractérisée par: 1) une sclérose cutanée du tronc et de la partie proximale des membres supérieurs et inférieurs, 2) une sclérose d'un ou de plusieurs organes internes (poumons, reins, cœur et appareil digestif), 3) une dilatation capillaire et/ou zone avasculaire au niveau des doigts par capillaroscopie, 4) l'absence d'anticorps anti-centromère (AAC), 5) la présence d'anticorps anti-ADN-topoisomérase I (anti-topo I; dans 30 % des cas (41)) et 6) la présence du PR (dans 95 % des cas (42)).

Pour sa part, la forme limitée, moins sévère, est caractérisée par: 1) une sclérose cutanée limitée aux mains, aux avant-bras, aux pieds, au visage ou absente, 2) l'apparition tardive d'hypertension pulmonaire, 3) la présence d'AAC (dans 70 à 80 % des cas (41)), une dilatation capillaire au niveau des doigts (sans zone avasculaire par capillaroscopie) et 4) la présence du PR, parfois pendant plusieurs années avant le développement de la sclérose.

Les deux formes de Scl sont également associées à différentes courbes de progression dans le temps. Ainsi, la dScl progresse généralement plus vite, atteignant un «pic» d'étendue et de sévérité quelques mois ou quelques années seulement après le diagnostic (43). Les premiers symptômes (fatigue, douleurs articulaires, gonflements au niveau des mains et des pieds, PR) sont rapidement suivis par l'apparition de fibrose cutanée, débutant aux extrémités des membres supérieurs et inférieurs et pouvant s'étendre au tronc. Les atteintes au niveau viscéral apparaissent souvent au cours des trois premières années de la maladie (44). Durant la phase aiguë de la dScl,

les complications les plus graves résultent généralement de «crise rénale» (45). À la phase aiguë succède une phase tardive, qui peut s'étendre sur plusieurs décennies, caractérisée par un ralentissement ou une régression de l'atteinte cutanée et une amélioration, légère ou marquée, de l'état du patient (43). Cependant, dans certains cas, la fibrose cutanée et viscérale continue de progresser jusqu'à la perte de fonction des organes. La fibrose pulmonaire est alors l'une des complications les plus graves associées à la dScl.

La lScl a une progression beaucoup plus lente, les patients pouvant avoir des manifestations du syndrome de Raynaud une ou plusieurs décennies avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Ces symptômes sont généralement du gonflement au niveau des doigts, accompagnées de douleurs articulaires légères. Des années plus tard, les patients peuvent développer de la calcinose et de la télangiectasie (dilatation de vaisseaux sanguins superficiels), deux conditions typiques à la lScl. La fibrose cutanée, habituellement limitée aux extrémités, progresse très rarement après la phase initiale de la maladie. À long terme, les patients avec lScl peuvent développer des ulcérations digitales et des reflux œsophagiens. La complication la plus grave associée à ce stade de la maladie est l'hypertension pulmonaire, causant la dyspnée et, à plus long terme, l'hypoxie ou l'insuffisance cardiaque (46).

La survie associée à la Scl est variable, allant de 60 à 80 % après 5 ans et de 40 à 60 % après 10 ans (47-50). Les causes de mortalité les plus fréquemment associées à cette maladie sont la fibrose pulmonaire (14 %) et l'hypertension pulmonaire (15 %) (51).

2.2. Épidémiologie et démographie

L'épidémiologie est la science qui étudie l'incidence et la prévalence d'une maladie dans une population. Les données épidémiologiques peuvent être d'une grande aide pour déterminer les facteurs de risque génétiques et environnementaux reliés à la maladie.

Les résultats des études épidémiologiques concernant la Scl varient grandement selon la période durant laquelle l'étude a été faite et la population étudiée. Ainsi, les études sur des populations nord-américaines font état d'incidences variant entre 2,7 nouveaux cas par million d'habitants par année pour la période entre 1947 et 1968 (52) et 18,7 pour la période entre 1972 et 1991 (53;54). De façon similaire, la prévalence de la Scl varie entre 138 cas par million d'habitants pour la période entre 1950 et 1979 (55) et 286 pour la période entre 1985 et 1991 (56;57). Ces données peuvent refléter une augmentation réelle de l'incidence et de la prévalence de la Scl dans le temps. Cependant, il est probable que cette divergence soit plutôt due à une meilleure sensibilité des méthodes diagnostiques depuis le début des années 70.

La population étudiée est un autre facteur qui influence les données épidémiologiques de la Scl. Par exemple, une étude faite au Royaume-Uni entre 1985 et 1986 rapporte une incidence de 3,7 et une prévalence de 31 (58). À l'autre extrême, une étude faite dans le sud de l'Australie entre 1993 et 1999 rapporte une incidence de 22,8 et une prévalence de 233 (59).

L'incidence et la prévalence de la Scl varient également à l'intérieur d'une même population, dépendamment de l'origine ethnique des individus. Ainsi, les Afro-

Américains sont plus susceptibles de développer la Scl que les Caucasiens vivant dans la même région (57). La communauté ethnique nord-américaine ayant la plus haute prévalence rapportée reste les Choctaws d'Oklahoma. La prévalence de la Scl chez cette population native est en effet de 1:660 (60), suggérant une susceptibilité génétique chez ce groupe ethnique.

Au point de vue démographique, la Scl est depuis longtemps reconnue pour toucher plus de femmes que d'hommes, avec un ratio moyen de 4:1 (51). Ce ratio tend cependant à s'atténuer chez les patients diagnostiqués après l'âge de 50 ans.

Le développement de la Scl se fait généralement chez des individus âgés entre 30 et 50 ans. Cette maladie n'est cependant pas restreinte à ce groupe d'âge et peut être diagnostiquée dès l'enfance (61) et également chez des individus âgés de plus de 70 ans (62;63).

2.3. Génétique

Même s'il existe des variations régionales substantielles dans l'incidence et la prévalence de la Scl, cette maladie semble présente partout dans le monde. Les raisons pour lesquelles certaines populations et ethnies présentent une susceptibilité accrue à cette maladie restent encore à déterminer. Bien qu'il existe des facteurs environnementaux et/ou occupationnels directement associés au développement de la Scl, comme par exemple une exposition à certaines poussières de silice (64), il reste que la grande majorité des cas ne présente aucun historique d'exposition à ces facteurs de risque.

Des facteurs génétiques seraient-ils en cause ? La très faible concordance de la Scl chez les jumeaux monozygotes (4.2%) (65) ainsi que les rares exemples de familles présentant plusieurs cas de Scl (66) mettent en doute l'importance de facteurs héréditaires dans le développement de cette maladie. Cependant, une étude récente démontre que le risque de développer la Scl est significativement plus élevé chez les membres d'une famille où il y a présence d'un cas que dans le reste de la population (1,6 % vs 0,026 %, respectivement) (67). Ainsi donc, un historique familial de Scl est le facteur de risque identifié à ce jour le plus fortement associé à une susceptibilité accrue de développer la maladie. Le risque demeure toutefois extrêmement faible.

Il est intéressant de noter que les études chez les jumeaux démontrent que même si la concordance de la Scl chez ces individus est faible, la concordance d'un profil moléculaire prédisposant à la maladie est plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes. Par exemple, la concordance pour la présence d'auto-anticorps est nettement plus élevée chez les premiers comparativement aux seconds (71 % vs 40 %, respectivement) (65). Aussi, une concordance plus élevée est également signalée pour un profil d'expression de gènes pro-fibrotiques chez les fibroblastes provenant de jumeaux monozygotes comparativement aux jumeaux dizygotes (40 % vs 20 %, respectivement) (68). Ces données suggèrent donc qu'il existe une composante génétique à la prédisposition au développement de la Scl. Cette prédisposition génétique n'est toutefois pas suffisante pour déclencher la maladie et d'autres facteurs, comme des mutations spontanées non héréditaires ou des facteurs environnementaux, semblent requis. La faible concordance de la Scl chez les

jumeaux prédisposés à la maladie pourrait donc s'expliquer par la relative rareté de ces facteurs.

Bien qu'aucun gène n'ait encore été directement associé au développement de la Scl chez l'humain, il existe des exemples de marqueurs génétiques dont la présence est associée avec la Scl. C'est le cas entre autres de certains gènes de la région de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces gènes, les gènes HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP, encodent pour des molécules exprimées sous forme d'hétérodimères à la surface de plusieurs types de cellules incluant les LB, des LT activés et les cellules dendritiques (DC). Ces hétérodimères sont requis pour la reconnaissance d'antigènes du non-soi par les LT qui ensuite coordonneront une réponse immunitaire adéquate. Or, une association entre certaines allèles des gènes HLA et la Scl est reconnue depuis maintenant plus de vingt-cinq ans (69-74). Le rôle des molécules de CMH de classe II dans le développement d'une susceptibilité à la Scl n'est toutefois pas déterminé. Parmi les autres gènes, dont certaines allèles ou polymorphismes ont été associés avec la Scl, il y a ceux encodant pour TGF- β (75), la fibilline-1 (76;77) et l'ostéonectine (SPARC) (78). Leur association avec la Scl est toutefois beaucoup moins documentée que celle des gènes du CMH de classe II.

Les données présentées plus haut tendent à appuyer la présence d'une composante génétique dans le développement de la Scl. Cependant, il est très probable que les gènes impliqués aient plus une influence au niveau de la susceptibilité d'un individu à développer la maladie qu'un rôle direct dans la pathogénèse de la Scl.

2.4. Microchimérisme

Le microchimérisme se caractérise par la présence d'un très faible taux de cellules allogéniques retrouvées chez un individu receveur. La principale source de microchimérisme est la grossesse qui permet un trafic cellulaire bi-directionnel avec persistance de divers types cellulaires après l'accouchement. Il a récemment été suggéré que le microchimérisme pourrait être à l'origine du développement de la Scl. Certaines études démontrent en effet une association entre le développement de cette maladie chez des femmes peu de temps après l'accouchement et la présence dans le sang de cellules fœtales (79;80). Ces cellules provoqueraient une réponse immunitaire allogénique contre des antigènes maternels (79;80). Cependant, la présence de microchimérisme chez plusieurs femmes saines contrôles remet en doute cette hypothèse.

3. Auto-anticorps et sclérose systémique

On détecte des auto-anticorps chez plus de 90 % des patients atteints de Scl (3). La majorité de ces auto-anticorps reconnaissent des auto-antigènes intra-nucléaires, sont hautement spécifiques à la Scl et sont associés à des phénotypes distincts de la maladie (Tableau III). Les anticorps anti-nucléaires (ANA) constituent donc des outils diagnostiques et pronostiques très utiles. Cependant, très peu de choses sont connues de leurs origines et leur rôle potentiel dans la pathogénie de la Scl reste à être élucidé.

Tableau III. ANA majeurs détectés dans la sclérose systémique*ANA spécifiques*

Antigène	Prévalence (%)	Forme	Phénotype	Réf.
ADN-topoisomérase I	15-20	Diffuse	Fibrose pulmonaire	(41;50;81-83)
Protéine centromérique B	20-50	Limitée	Hypertension pulmonaire, CREST	(50;81;83-89)
ARN polymérase I et III	10-20	Diffuse	Atteinte cutanée sévère, crise rénale	(90-93)
Th/To	2-5	Limitée	Atteinte pulmonaire, crise rénale	(87;94-99)

ANA non-spécifiques

Antigène	Prévalence (%)	Forme	Phénotype	Réf.
PM/Scl	<5	Limitée	Myosite	(97;100-104)
U3-RNP (Fibrillarine)	<5	Diffuse	Hypertension artérielle pulmonaire et atteintes cardiaques	(105-109)
U1-RNP	2-14	L et D	Chevauchement avec d'autres CTD	(91;110;111)
B23	11	L et D	Hypertension pulmonaire	(112)
hUBF (NOR-90)	<5	Limitée	Indéterminé	(113)

Scl, sclérose systémique; CREST, calcifications, Raynaud, atteinte oesophagienne, sclérodactylie, télangiectasies; L et D, limitée et diffuse; CTD, maladie du tissu conjonctif.

3.1. ANA spécifiques à la sclérose systémique

La fréquente présence d'ANA dans le sérum de patients atteints de Scl a été rapportée dès le début des années soixante (114;115). Quatre de ces ANA sont spécifiques à la Scl et comptent pour 60 à 90 % des auto-anticorps détectés dans la maladie. Il s'agit des anticorps anti-topo I, AAC, anti-ARN polymérase I/III (anti-ARNP) et anti-Th/To. Ces auto-anticorps sont mutuellement exclusifs et chacun est associé à un groupe de patients ayant un phénotype de Scl particulier.

3.1.1. Anticorps anti-ADN-topoisomérase I

En 1979, une protéine de 70 kDa, basique, non histone et associée à la chromatine est rapportée comme étant ciblée par des auto-anticorps de patients avec Scl (116). Cette protéine, initialement désignée Scl-70, est subséquemment identifiée comme étant l'ADN topoisomérase I (topo I) (82;117).

La topo I est une enzyme nucléaire de 100 kDa responsable de la relaxation de la structure hélicoïdale de l'ADN lors de sa transcription et sa duplication (118). Cette protéine possède quatre domaines majeurs : 1) un domaine NH₂-terminal (acides aminés (aa) 1 à 200) contenant quatre signaux de localisation nucléaire, 2) un domaine central («core domain», aa 200 à 635), 3) un «linker domain» (aa 636 à 712) et 4) un domaine COOH-terminal (aa 713 à 765) (119). Les domaines central et COOH-terminal sont responsables de l'activité catalytique de la topo I (119). Le domaine NH₂-terminal est très sensible à la protéolyse et la topo I se dégrade facilement en fragments de 70 kDa (fragment majeur), 80 et 87 kDa (fragments mineurs) (82) qui retiennent cependant leur activité enzymatique (120;121).

La détection des anti-topo I dans les séra de patients se fait par immunodiffusion ou par ELISA («Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay»). La présence de ces anticorps dans les séra est caractérisée par un patron d'immunofluorescence indirecte nucléolaire (Fig. 1A et B) (90). L'épitope majeur de la topo I correspond aux résidus d'aa 547-565 (122-124) et serait de nature conformationnelle (122;125).

Les anti-topo I sont présents chez 15 à 20 % des patients atteints de Scl (41;50;81) et sont fortement spécifiques à cette maladie. En effet, ces anticorps ne sont pratiquement jamais détectés chez les individus normaux (3;83;126-128), les

individus non atteints ayant un lien de parenté avec les patients sclérodermiques (126) (à l'exception des jumeaux homozygotes (65)) et les patients atteints d'autres connectivites (129;130).

Les anti-topo I et les AAC sont mutuellement exclusifs, ayant été détectés simultanément chez seulement 0,5 % des patients avec Scl (3;50;81;127;131).

Les anti-topo I sont associés à la forme diffuse de la Scl, étant présents chez environ 40 % des patients atteints de cette forme, comparativement à 10 % des patients atteints de lScl (3;74;83;127;132). Ainsi, la détection d'anti-topo I chez les individus se présentant initialement avec le syndrome de Raynaud confère un risque accru de développement de la dScl (133;134).

Près de 45 % des patients qui développent de la fibrose pulmonaire possèdent des anti-topo I (3). Ces anticorps sont également associés à une fibrose pulmonaire plus sévère (3;6;11;41;81), ainsi qu'à une mortalité plus élevée, attribuée à une augmentation des taux de dysfonctionnement ventriculaire secondaire à l'atteinte pulmonaire (135;136).

Les patients sclérodermiques qui sont initialement positifs pour la présence d'anti-topo I le restent généralement tout au long de la maladie, malgré les traitements (125;137). Les titres sériques d'anti-topo I ainsi que les épitopes dominants reconnus par ces anticorps peuvent cependant varier avec le temps, suggérant un renouvellement continu de la réponse auto-immune (125). Il existe également des exemples de patients chez qui les anti-topo I sériques disparaissent après une certaine période (13). Cette disparition est associée à une diminution de LT topo I-spécifiques activés en circulation (13). Il est intéressant de noter que si la proportion de LT topo

I-spécifiques activés diminue chez ces patients, la proportion de LT topo I-spécifiques non activés reste comparable aux contrôles normaux, ce qui signifie que la disparition des anti-topo I est due à une perte de stimulation antigénique, et non à une perte de la population de LT topo I-spécifiques (13).

La présence d'anti-topo I est associée avec les allèles *HLA-DRB1*1101* et *HLA-DRB1*1104* chez les Caucasiens et les Afro-Américains et avec l'allèle *HLA-DPBI*1104* chez les Hispaniques (74;138;139).

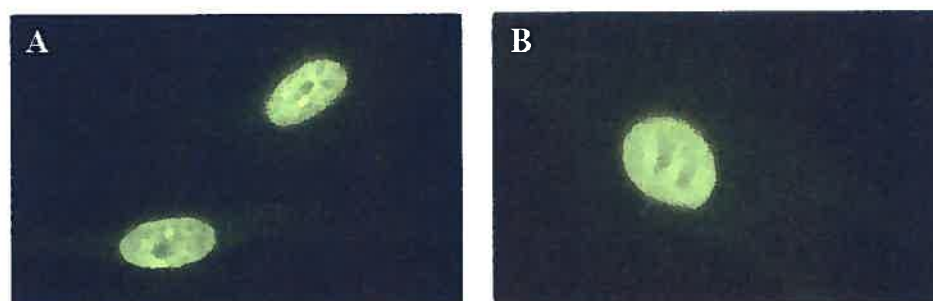


Figure 1. A et B. Exemples de patron d'immunofluorescence indirecte d'anti-topo I sur des fibroblastes humains.

3.1.2. Anticorps anti-centromère

Les AAC furent décrits pour la première fois en 1980 lorsque des cellules HEp-2 («Human Epithelioma Larynx N°2») furent utilisées pour identifier des patrons distinctifs d'immunofluorescence indirecte d'ANA (89). La présence d'AAC dans les sera est caractérisée par un patron d'immunofluorescence indirecte nucléaire moucheté qui suit l'alignement des centromères lors de la mitose (Fig. 2A et B). Les cibles des AAC furent subséquentement identifiées par immunobuvardage comme étant six différentes protéines centromériques (140-146). Les protéines

centromériques (CENP) sont des protéines associées au centromère qui forment le kinétochore, structure qui lie le centromère du chromosome au fuseau mitotique durant la mitose (147). Ainsi, jusqu'à maintenant, les protéines CENP-A à CENP-F ont été identifiées comme cibles possibles des AAC présents dans les sera de patients sclérodermiques: la CENP-A (17 kDa) est une protéine «H3-like» spécifique au centromère (142), la CENP-B (80 kDa) est une protéine liant l'ADN et joue un rôle dans son organisation (143), la CENP-C (140 kDa) est une composante du chromosome nécessaire à l'assemblage du kinétochore (144;145), la CENP-D (50 kDa) est un antigène du centromère ayant une fonction inconnue (140), la CENP-E (312 kDa) est une protéine moteur «kinesin-like» impliquée dans l'anaphase (141) et la CENP-F (400 kDa) est une protéine de la matrice nucléaire qui s'assemble au kinétochore durant la mitose (141;146).

Les AAC sont également appelés anti-CENP-B parce que tous les sera de patients sclérodermiques contenant des AAC reconnaissent la CENP-B (85). De plus, un ELISA utilisant une protéine de fusion CENP-B comme antigène a été établi comme outil de dépistage standardisé des AAC dans la Scl (85;88;148;149).

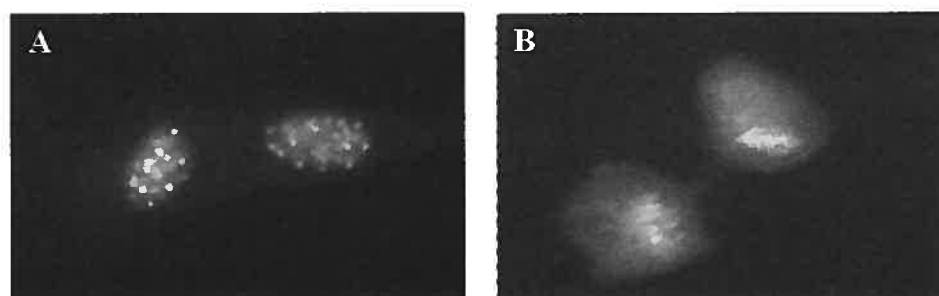


Figure 2. A. Exemples de patron d'immunofluorescence indirecte d'AAC sur des fibroblastes humains. B. Fibroblastes en mitose.

Les AAC sont présents chez 20 à 50 % des patients atteints de Scl, le pourcentage variant selon l'ethnicité. Ainsi, ces anticorps sont plus fréquemment détectés chez les patients caucasiens, alors que leur fréquence est beaucoup moindre chez les patients hispaniques, afro-américains et thaïs (50;57;74;81;83;88;132). Ces anticorps sont considérés comme un marqueur de la Scl. En effet, ils sont rarement présents chez les individus normaux (150-152) et les individus sains ayant un lien de parenté avec un patient atteint de Scl (126;153) (à l'exception des jumeaux monozygotes (65)) et sont également relativement rares chez les patients souffrants d'autres connectivites (129;130;150;151). Lorsque détectés chez les patients atteints du PR, ils constituent un facteur de risque de développement de la Scl (3;83;127;133;134).

Les AAC sont associés à la forme limitée de la Scl, et surtout avec une variante de cette forme, appelée CREST, qui est caractérisée par la présence de calcifications, du PR, d'une atteinte oesophagienne, de sclérodactylie et de télangiectasies (6;41;81;87;89). Les AAC sont associés à un meilleur pronostic. En effet, comparativement aux patients exprimant des anti-topo I, les patients positifs pour les AAC ont un taux de mortalité plus faible et ont moins de chance de développer de la fibrose pulmonaire (6;41;50;87;154). Cependant, ces patients sont plus à risque de développer de l'hypertension pulmonaire (87;155).

Les patients sclérodermiques positifs pour les AAC tendent à le rester tout au long de la maladie (156-158). Il est intéressant de noter que, chez ces patients, la présence d'AAC d'isotype IgM est toujours associée avec une présence soutenue d'AAC d'isotype IgG, ce qui suggère une présentation d'auto-antigènes constamment renouvelée (158).

Les allèles *HLA-DRB1*01*, *HLA-DRB1*04* et *HLA-DQB1*05* sont associés à la présence d'AAC (74;159) et il semble probable que la production de ces anticorps soit influencée par la présence des antigènes HLA-DRB1 et HLA-DQB1 (74;139).

3.1.3. Anticorps anti-ARN polymérase

Les anti-ARNP ont été détectés chez des patients atteints de Scl pour la première fois en 1987 et 1993 (93;160). Les ARNP sont des enzymes impliqués dans la transcription des ARN. Il en existe trois : l'ARNP I, qui est présente dans les nucléosomes et participe à la synthèse de l'ARN ribosomal et nucléolaire, l'ARNP II, qui est présente dans le nucléoplasme et qui participe à la synthèse des précurseurs des ARN messagers et de la plupart des ARN du nucléoplasme, et l'ARNP III, qui est également présente dans le nucléoplasme et qui est responsable de la synthèse de petits ARN (37). Chaque ARNP est composée de deux protéines de plus de 100 kDa et de plusieurs autres plus petites (161).

La fréquence des anti-ARNP chez les patients sclérodermiques est de 10 à 20 %, ce qui les place au troisième rang derrière les AAC et les anti-topo I (90-93;162-164). Les anti-ARNP I et III sont spécifiques à la Scl (92;93;161), contrairement aux anti-ARNP II, qui sont également détectés chez des patients atteints de lupus systémique érythémateux (SLE) (165). Les anti-ARNP I et III sont, par conséquent, les anti-ARNP ayant une véritable valeur diagnostique pour la Scl. Ces anticorps coexistent presque invariablement chez les patients, alors que les anti-ARNP II peuvent se retrouver seuls ou avec des anti-topo I (92;93;161). Parce que la détection d'anti-ARNP I et III par immunofluorescence indirecte n'est pas fiable, la présence de ces

anticorps dans les séra est généralement détectée par l'entremise de tests ELISA (163;166).

Les anti-ARNP I et III sont associés à la forme diffuse de la Scl et sont présents chez environ 40 % des patients atteints de cette forme. Ces anticorps sont également associés à une atteinte cutanée sévère, à une insuffisance rénale aiguë (ou crise rénale), et à un taux de mortalité plus élevé, généralement relié à une défaillance cardiaque (93;135;154;160;162;163;167;168).

Contrairement aux AAC et aux anti-topo I, la présence d'anti-ARNP I et III ne semble pas être associée à un ou des allèles du gène HLA de classe II dans la Scl (167;169). En effet, une seule étude rapporte une association entre les anti-ARNP I et III et les allèles *HLA-DRB1*0405* et *HLA-DQB1*0401* chez des patients japonais et avec l'allèle *HLA-DRB3*02* chez des patients caucasiens (170). Cependant, ces associations demeurent relativement faibles.

3.1.4. Les anti-Th/To

Les anti-Th/To ont pour cible des composantes du complexe de ribonucléases P/MRP, plus particulièrement les protéines Rp25 et hPop1 (98). Les ribonucléases P/MRP sont des nucléases intranucléolaires impliquées dans le traitement de l'ARN ribosomal.

Les anti-Th/To se retrouvent chez 2 à 5 % des patients sclérodermiques et sont associés à la forme limitée de la maladie. Bien qu'il soit généralement reconnu que les patients positifs pour ces anticorps aient une atteinte cutanée et systémique moins sévère que les patients avec des AAC (87;95;96;98;135;171), les manifestations

cliniques associées à ces anticorps varient selon les études. Ainsi, une étude montre que les patients positifs pour la présence d'anti-Th/To ont une fréquence accrue d'atteintes à l'intestin grêle et d'hypothyroïdie et une survie à 10 ans diminuée comparativement aux patients avec des AAC, causés en grande partie par une augmentation des risques d'hypertension pulmonaire (96). Deux autres études montrent une association entre la présence d'anti-Th/To et un risque accru de crise rénale et d'hypertension pulmonaire (172;173). Finalement, une autre étude faite avec des patients atteints de différentes connectivites, incluant la Scl, montre une association entre les anti-Th/To et la xérophtalmie (yeux secs), une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DL_{CO}) et une diminution de la motilité œsophagienne (174).

La présence des anti-Th/To a été associée avec l'allèle *HLA-DRB1*11* (53;94).

3.2. ANA non spécifiques à la sclérose systémique

Outre les ANA spécifiques à la Scl cités plus haut, il existe des ANA dont la présence, quoique non exclusive à la Scl, est tout de même associée à cette maladie. Parmi ces ANA, on retrouve les anticorps anti-nucléolaires (AANo). Les AANo sont un regroupement hétérogène d'auto-anticorps qui ont en commun une réactivité contre des antigènes du nucléole. Ce regroupement d'anticorps, généralement mutuellement exclusifs, comprend les anti-PM-Scl, les anti-fibrillarine (U3-RNP), les anti-U1-RNP, les anti-B23 et les anti-hUBF (NOR-90) (97). Ensemble, ces anticorps

sont détectés chez 10 à 30 % des patients atteints de Scl (3;41;175). Ils sont rarement détectés chez les individus normaux (81;87;176).

3.2.1. Les anti-PM/Scl

Les anti-PM/Scl ont été les premiers anticorps anti-nucléolaires à être caractérisés. Leur nom découle du fait que ces anticorps ont initialement été découverts chez des patients atteints de polymyosite (PM) et/ou de Scl (177). Les cibles majeures des ces anticorps sont les protéines PM/Scl-75 et PM/Scl-100, des composantes de l'exosome nucléolaire humain impliqué dans la dégradation de plusieurs espèces d'ARN (178). Plus récemment, six autres protéines de l'exosome humain ont également été identifiées comme cible antigénique des anti-PM/Scl: hRrp4p, hRrp40p, hRrp41p, hRrp42p, hRrp46p et hCs14p (179).

La fréquence des anti-PM/Scl chez les patients sclérodermiques varie entre 2 et 3 % (97;101). Les anti-PM/Scl se retrouvent plus fréquemment chez les patients souffrant du syndrome de chevauchement entre polymyosite et Scl (180;181). Ces anticorps sont présents chez environ 50 % des patients atteints de ce syndrome (101) et près de 80 % des patients positifs pour les anti-PM/Scl vont éventuellement développer ce syndrome (181).

Les anti-PM/Scl sont généralement associés à la lScl, quoique le pronostic ne soit pas aussi fiable qu'avec les AAC, et sont présents chez environ 15 % des patients atteints de cette forme (154;162;171). Ces anticorps sont associés à une atteinte cutanée moins sévère, à la survenue d'arthrite et d'une myopathie inflammatoire et à un bon pronostic (101;154;162;171).

Une forte association a été démontrée entre les anti-PM/Scl et les allèles *HLA-DQA1*0501* et *HLA-DRB1*0301* (159).

3.2.2. Les anti-fibrillarine (anti-U3 RNP)

Les anti-fibrillarine (ou anti-U3 RNP) ont été détectés pour la première fois chez des patients sclérodermiques en 1988 (97). Leur cible, la fibrillarine, est une protéine basique de 34 kDa qui fait partie de la l'U3 RNP. Les «small nucleolar ribonucleoproteins» (snRNP) sont des complexes formés par des protéines et de l'ARN qui se localisent dans le nucléole. L'U3 RNP est la plus abondante des snRNP et est composée d'un ARN de 217 nucléotides et de plusieurs protéines, dont la fibrillarine. Cette protéine est impliquée dans la formation de l'ARN ribosomal (37).

Les anti-fibrillarine sont présents chez approximativement 4 % des patients avec Scl et sont mutuellement exclusifs avec les AAC, les anti-topo I et les anti-ARNP (182). Outre la Scl, ces anticorps ont été décrits chez des patients souffrant de SLE, de connectivite dite indifférenciée («undifferentiated connective-tissue disease», UCTD) et de PR (174).

Ces anticorps sont hautement associés à la dScl, surtout chez les patients afro-américains (97;105;154;155;168;182). En effet, la présence des anti-fibrillarine chez ce groupe ethnique est presque toujours associée à la dScl (90;105;182). Les patients atteints de dScl et qui sont positifs pour les anti-fibrillarine sont plus à risque de développer une atteinte cutanée diffuse, des complications viscérales sévères, une hypertension artérielle pulmonaire et une atteinte digestive basse (105;106).

Cependant, chez les patients atteints de lScl, les anti-fibrillarine ne sont associés à aucune manifestation clinique particulière (183).

Les anti-fibrillarine semblent être préférentiellement associés à l'allèle *HLA-DQB1*0604* (105). Cette association n'est toutefois pas rapportée dans une autre étude (169).

3.2.3. Les anti-U1-RNP, anti-B23 et anti-hUBF (NOR-90)

Les anti-U1-RNP, les anti-B23 et les anti-hUBF (NOR-90), moins extensivement étudiés, pourraient avoir un potentiel pronostique non négligeable.

Les anti-U1-RNP ont pour cible les RNP, des protéines impliquées dans l'épissage d'ARN nucléaire en ARN messager (mARN) (184). Ces anticorps ont été détectés chez des patients atteints de Scl, de SLE, de PM et du syndrome précédemment connu sous le nom de maladie mixte du tissu conjonctif (MCTD) (185).

Les anti-U1-RNP sont présents chez 2 à 14 % des patients sclérodermiques (74;91;110;111;155;185). Ces anticorps sont associés à un bon pronostic, à des atteintes cutanées et rénales moins sévères et à une réponse favorable aux traitements aux corticostéroïdes (181;185).

Les anti-B23 ont pour cible B23, une des protéines les plus abondantes dans le nucléole (186). Cette protéine est impliquée dans le traitement de l'ARN ribosomal et dans l'assemblage des ribosomes (187-189).

Les anti-B23 ont été détectés chez environ 11 % des patients sclérodermiques et sont hautement associés à l'hypertension pulmonaire (112). Contrairement aux autres AANo, les anti-B23 sont presque toujours détectés conjointement avec les anti-

fibrillarine (dans 80 % des cas) et fréquemment avec les anti-U1-RNP. Les anti-B23 sont cependant mutuellement exclusifs avec les AAC et semblent définir un sous-groupe de patients présentant une atteinte cutanée limitée mais une atteinte pulmonaire plus sévère (112).

Les anti-hUBF (NOR-90) reconnaissent le «human upstream-binding factor» (hUBF), un facteur de transcription nucléolaire, également connu sous le nom de «90 kDa nucleolar organizing region associated protein» (NOR-90) (190), qui a pour fonction de réguler la transcription de l'ARN ribosomal (191;192).

Les quelques études faites sur les anti-hUBF montrent que ces anticorps sont associés à la Scl mais peuvent également se retrouver chez des patients atteints du syndrome de Sjogren, d'arthrite rhumatoïde (AR) ou du PR (193-196). Ces anticorps ont été rapportés chez moins de 5 % des patients sclérodermiques et ne sont associés à aucun phénotype particulier de la Scl (113;193-197). Cependant, les anti-hUBF, lorsque détectés chez des enfants avec le PR, semblent être un marqueur de risque accru de développer la lScl (113;197).

3.3. Autres auto-anticorps dans la sclérose systémique

Récemment, de nombreux auto-anticorps, autres que les ANA, ont été décrits comme étant associés à la Scl. Ces anticorps ont pour cible une variété hétéroclite d'antigènes cytoplasmiques, membranaires ou extra-cellulaires. Bien que leur caractérisation demeure encore incomplète et que leur valeur pronostique reste souvent à déterminer, ces anticorps ont un potentiel informatif non négligeable.

3.3.1. Les anti-cellules endothéliales (AECA)

Les AECA font partie, avec les anti-fibroblastes (AFA), d'un sous-groupe d'auto-anticorps présents dans la Scl capable de lier la surface cellulaire et de provoquer des changements phénotypiques chez leurs cellules cibles.

Les AECA sont détectés chez 28 à 54 % des patients atteints de Scl et sont associés à la dScl (198-200). Certaines études montrent une association entre les AECA et la fibrose pulmonaire chez les patients sclérodermiques (198;201), alors qu'une autre met plutôt en évidence une association avec la présence d'infarctus digitaux, de gangrène et d'hypertension artérielle pulmonaire (199). Les AECA semblent également associés à une forme plus sévère de la maladie (200).

Bien qu'une étude fasse état d'antigènes membranaires de 18 à 19 kDa reconnus par les AECA (202), la cible antigénique des AECA à la surface des cellules demeure encore indéterminée.

Ces anticorps pourraient avoir des effets pathogènes directs dans la Scl. En effet, il a été démontré *in vitro* que les AECA peuvent activer les cellules endothéliales et induire l'expression de molécules d'adhésion (203). Les AECA peuvent également provoquer l'apoptose des cellules endothéliales lorsque ils sont ajoutés au milieu de culture en présence ou non de «natural killer cells» (NK) (9;199;204). Récemment, des études *in vivo* faites sur des biopsies cutanées de patients sclérodermiques ont montré une co-localisation des AECA avec des cellules endothéliales en apoptose (205). Ces derniers résultats suggèrent que les AECA pourraient jouer un rôle dans l'initiation des dommages aux cellules endothéliales, un évènement très précoce dans la Scl.

3.3.2. Les anti-fibroblastes (AFA)

Les AFA ont été détectés chez 23 à 58 % des patients sclérodermiques, avec une prévalence marquée pour les patients atteints de dScl (5;206). Jusqu'à maintenant, aucune association entre la présence des AFA et des manifestations cliniques particulières n'a été clairement établie et la ou les cibles antigéniques de ces anticorps à la surface des fibroblastes reste à déterminer.

Les AFA pourraient jouer un rôle dans l'activation des fibroblastes dans la Scl. En effet, la liaison de ces anticorps induit l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines pro-fibrotiques chez les fibroblastes (5).

3.3.3. Les anti-Ku

Ku est un antigène intranucléaire composé d'un complexe de 2 peptides (70 et 86 kDa) capables de lier l'ADN. Les anti-Ku furent d'abord décrits chez des patients atteints de syndrome de chevauchement Scl-PM (207). Ces anticorps sont présents chez environ 14 % des patients avec Scl (208) et pourraient être associés à de l'hypertension pulmonaire (209). Les anti-Ku sont également présents chez des patients atteints de plusieurs autres maladies du tissu conjonctif et n'ont qu'une très faible valeur diagnostique et pronostique (208;210).

3.3.4. Les anti-fibrilline-1

Les anti-fibrilline-1 ont originalement été détectés chez les souris Tsk-1/+, un modèle murin de Scl possédant un allèle mutant du gène codant pour la fibrilline-1 (211). La

fibrilline-1 est une glycoprotéine structurelle des microfibrilles de la MEC (37). La fréquence des anti-fibrilline-1 chez les patients avec Scl varie énormément selon l'ethnie. Ainsi, ces anticorps ont été détectés chez 94 % des Amérindiens Choctaw, 87 % des Japonais, 8 à 34 % des Caucasiens et 4 % des Afro-Américains (105;212). La présence de ces anticorps a été associée à la dScl et au CREST (212).

Comme les AFA, les anti-fibrilline-1 pourraient jouer un rôle dans l'activation des fibroblastes dans la Scl. En effet, il a récemment été démontré que les anti-fibrilline-1 induisent la production de composantes de la MEC, notamment le collagène, par les fibroblastes (10). La production de MEC est inhibée par l'ajout d'anti-TGF- β dans le milieu de culture, suggérant que les anti-fibrilline-1 induisent l'activation des fibroblastes en provoquant le relâchement du TGF- β latent présent dans la MEC (10).

3.3.5. Les anti-collagènes

D'autres auto-anticorps ayant pour cible des composantes de la MEC ont également été rapportés chez des patients atteints de Scl. Des anticorps dirigés contre les collagènes I, III, IV, VI et la laminine ont été détectés chez les patients sclérodermiques, surtout durant la phase initiale de la maladie (213). Ces anticorps, particulièrement les anti-collagènes IV, pourraient être associés à une atteinte pulmonaire plus sévère (214).

3.4. Origine

La présence quasi universelle d'auto-anticorps chez les patients atteints de Scl suggère que les mécanismes menant à leur production soient intimement liés à ceux

impliqués dans le développement de la maladie. On sait toutefois très peu de choses sur l'origine de ces auto-anticorps. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer leur existence (Tableau IV).

Tableau IV. Mécanismes de survenue des auto-anticorps dans la Scl

-
- Mimétisme moléculaire entre des auto-antigènes et des antigènes du non-soi.
 - Altération des auto-antigènes lors d'apoptose et/ou de nécrose cellulaire.
 - Relocalisation des auto-antigènes lors d'apoptose cellulaire.
 - Fragmentation des auto-antigènes dans des conditions ischémiques par des métalloprotéases.
 - Activation polyclonale des LB surexprimant CD19 sous l'influence d'un excès d'IL-4.
-

Parmi les mécanismes proposés, on retrouve le mimétisme moléculaire. La production d'auto-anticorps serait conséquente à une infection virale où l'agent infectieux posséderait un ou des épitopes similaires à un auto-antigène. Ainsi, certains auto-anticorps présents dans la Scl ont des réactions croisées avec la protéine UL94 du cytomégalovirus (215). De plus, des similitudes ont été rapportées entre la séquence de la topo I et celle de la protéine UL70 du cytomégalovirus (216) et de la protéine p30gag présente chez certains rétrovirus (217). Des similitudes sont également détectées entre la séquence de la fibrillarine et celle de la protéine P40 du virus de l'herpes type I et d'une protéine nucléaire du virus de l'Epstein-Barr (218).

Une altération des auto-antigènes pourrait aussi expliquer la génération d'une réponse auto-immune. Lors de l'apoptose et de la nécrose cellulaire, deux phénomènes détectés dans la Scl (voir section 4 pour plus de détails sur l'apoptose et la nécrose) (205;219;220), plusieurs protéases clivent les protéines intracellulaires, révélant ainsi

des épitopes cryptiques (221-225). La reconnaissance de ces nouveaux épitopes par les LB résulterait en la production d'auto-anticorps dirigés contre les protéines natives. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses études qui révèlent que l'antigénicité de plusieurs protéines intracellulaires est modifiée et/ou s'accroît lorsqu'elles sont clivées (221;224;226-228).

L'apoptose donne également lieu à une relocalisation de certaines protéines intracellulaires, altérées ou non, vers la membrane plasmique (229-235). Cette redistribution des protéines intracellulaires pourrait faciliter la reconnaissance d'auto-antigènes par le système immunitaire.

Une altération des auto-antigènes pourrait également se produire lors des épisodes d'ischémie-reperfusion signalés dans la Scl. En effet, il a été démontré que les radicaux libres d'oxygène générés lors des périodes d'hypoxie cellulaire clivent certains auto-antigènes spécifiques à la Scl (236).

Finalement, une activation polyclonale des LB, causée par une production excessive d'IL-4 par les LT, une surexpression de CD19 ou une combinaison des deux phénomènes, pourrait provoquer un bris de tolérance envers certains auto-antigènes, résultant en une production d'auto-anticorps (237).

La spécificité des auto-anticorps associés à la Scl demeure un des aspects les plus intrigants de la maladie. Le bris de tolérance envers certains antigènes spécifiques pourrait être dû à des facteurs génétiques impliqués dans la présentation de ces antigènes. La plupart des auto-anticorps présents dans la Scl sont associés à des haplotypes particuliers des gènes de la région de classe II du CMH

(74;74;138;139;159;170). La présence de certains haplotypes chez un individu pourrait expliquer sa susceptibilité à développer un type d'auto-anticorps plutôt qu'un autre. Elle pourrait également expliquer que la plupart des auto-anticorps soient mutuellement exclusifs.

Comme il a été spécifié plus haut, la plupart des auto-anticorps dans la Scl sont associés à des manifestations cliniques particulières dans la maladie. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition de ces auto-anticorps pourrait nous permettre de mieux comprendre pourquoi un individu développe un phénotype de la maladie plutôt qu'un autre.

4. Mort cellulaire et auto-antigènes bifonctionnels

L'apoptose et la nécrose cellulaire ont toutes deux été détectées dans des biopsies de tissus provenant de patients sclérodermiques (205;219;220). Comme il a été mentionné dans la section précédente (section 3.4), il est possible que ces phénomènes soient directement reliés à l'altération et/ou à la relocalisation d'auto-antigènes et, subséquemment, à la production d'auto-anticorps.

L'apoptose et la nécrose peuvent également donner lieu à un relâchement de certains auto-antigènes dans le milieu extracellulaire (238-242). Ces auto-antigènes, qui ont normalement une fonction déterminée dans la cellule, peuvent alors acquérir une fonction nouvelle dans l'environnement extracellulaire. De récentes études suggèrent que la bifonctionnalité de certains auto-antigènes joue un rôle important dans le contexte de maladies auto-immunes, comme la Scl (243-246). Le but de cette section

est donc de revenir brièvement sur l'apoptose et la nécrose cellulaire et de faire un survol des nouvelles données concernant les auto-antigènes bifonctionnels.

4.1. Apoptose vs nécrose cellulaire

La nécrose cellulaire est un phénomène irréversible qui fait suite à un débalancement extrême des conditions physiologiques entourant la cellule (ex. hypothermie, hypoxie). Elle survient lorsque la cellule est incapable de maintenir son homéostasie et que l'intégrité de la membrane plasmique est compromise. Le contenu cytoplasmique de la cellule se déverse alors dans le milieu environnant, causant de l'inflammation (Fig. 3) (239). La nécrose est une mort cellulaire dite «non physiologique» puisqu'elle est toujours le résultat de circonstances pathologiques.

Contrairement à la nécrose, l'apoptose cellulaire est un phénomène qui se produit généralement dans des conditions physiologiques normales (ex. embryogénèse, induction et maintien de la tolérance immunitaire, développement du système nerveux). Elle est étroitement régulée par des voies de signalisation intracellulaires qui aboutissent aux mitochondries. Sous l'effet de signaux pro-apoptotiques, les mitochondries relâchent diverses substances (dont les cytochromes C) qui induisent l'activation de protéases à cystéine (les caspases) et, subséquemment, l'activation de cascades protéolytiques menant à la mort cellulaire. Les caractéristiques morphologiques d'une cellule en apoptose incluent: une condensation de la chromatine et du cytoplasme, la formation de corps apoptotiques pouvant refermer des ribosomes, des mitochondries et du matériel nucléaire et le maintien de l'intégrité membranaire (Fig. 3). En conditions normales, les corps apoptotiques sont

rapidement phagocytés par les cellules avoisinantes et aucune inflammation n'est induite (239).

Dans certaines conditions (ex. déficience ou saturation des mécanismes phagocytaires), il arrive que les corps apoptotiques perdurent et se lysent, déversant leur contenu dans le milieu extracellulaire. On parle alors de «nécrose secondaire» ou d'apoptose tardive (242).

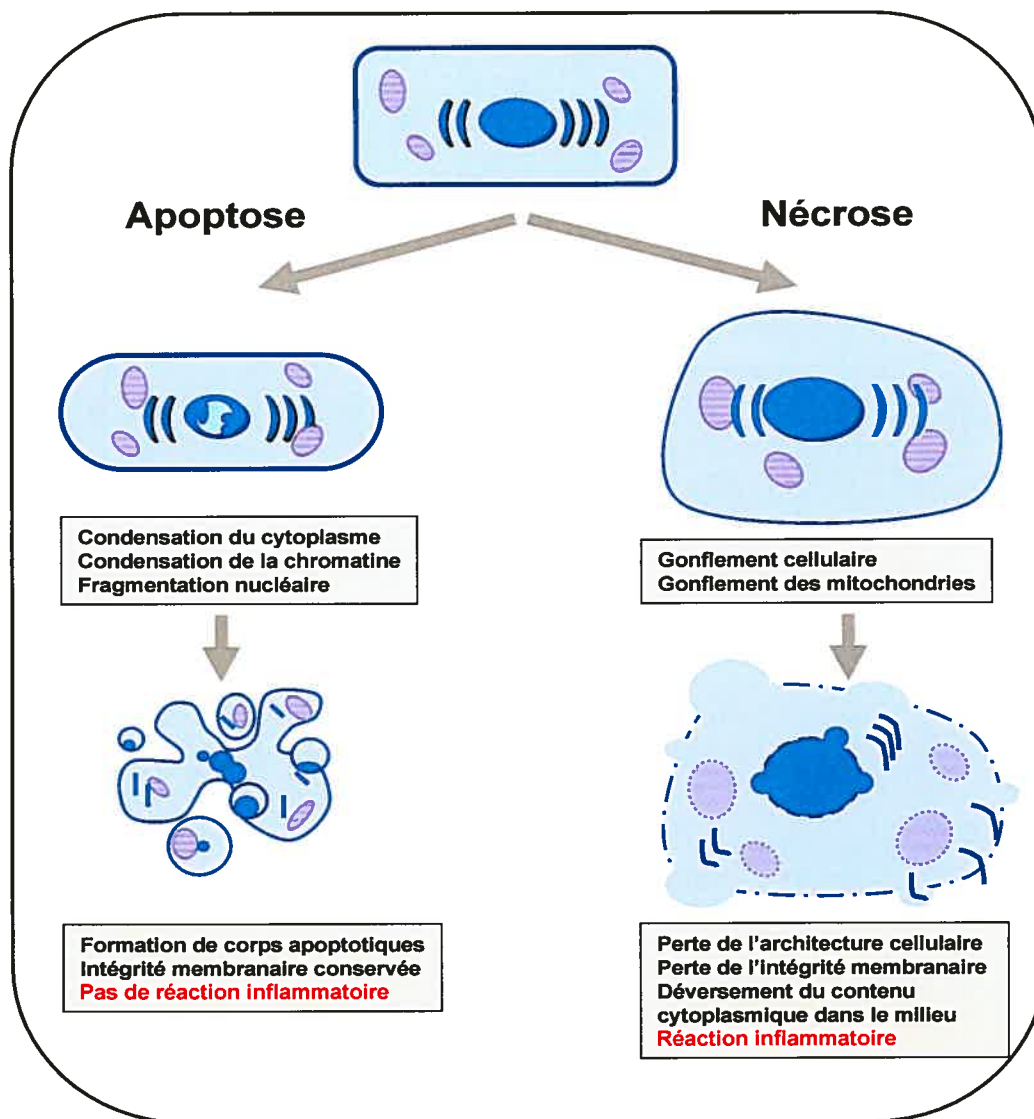


Figure 3. Apoptose vs nécrose cellulaire

4.2. Auto-antigènes bifonctionnels

Les auto-antigènes sont un groupe très restrictif d'antigènes du soi capables d'induire une réponse immunitaire adaptative. Les raisons expliquant que ces antigènes, qui représentent en tout moins de 4 % de tous les antigènes cellulaires (246), soient plus susceptibles que les autres de causer un bris de la tolérance sont encore en grande partie inconnues. De récentes études ont cependant mis en lumière une qualité propre à plusieurs auto-antigènes qui pourrait expliquer leur propension à induire l'auto-immunité.

La plupart des maladies auto-immunes sont associées à la présence de dommage cellulaire, souvent au niveau de tissus très spécifiques (ex. cartilages des jointures lors d'AR, glande thyroïde lors de thyroïdite d'Hashimoto, tissus conjonctifs lors de Scl). Or, lors de dommage cellulaire, il arrive que certains auto-antigènes soient relâchés dans le milieu extracellulaire, soit par des cellules en nécrose, en apoptose ou en nécrose secondaire (238-242). Certains auto-antigènes pourraient alors devenir de puissants chimioattractants, menant à une amplification des réponses pro-inflammatoires et à l'auto-immunité.

Récemment, O.M. Howard et son groupe de recherche ont démontré que l'histidyl-tARN synthétase (hisAS) et l'asparaginyl-tARN synthétase (asnAS), deux enzymes contre lesquelles près de 25 % des patients atteints de polymyosite et de dermatomyosite développent des auto-anticorps (247), peuvent induire la migration de LT et de DC immatures (243). En effet, ces enzymes, qui sont normalement impliquées dans la formation d'aminoacyl-tARN, peuvent, lorsque relâchées dans le milieu extracellulaire, activer les récepteurs chimiotactiques CCR3 et CCR5 à la

surface des LT et de DC immatures et induire la migration cellulaire (243). De manière intéressante, l'aspartyl et la lysyl-tARN synthétases, deux synthétases n'ayant pas de propriété auto-antigénique, se révèlent ne pas être chimiotactiques.

Par la suite, le même groupe de recherche a démontré que plusieurs auto-antigènes, associés à différentes maladies auto-immunes, possèdent des qualités chimiotactiques similaires à l'hisAS et l'asnAS (Tableau V) (246).

Tableau V. Auto-antigènes chimiotactiques pour les Dc immatures (246).

Auto-antigène	Maladie auto-immune associée
Fibrillarine	Scl
Topoisomérase I	Scl
«Interphosphoreceptor retinoid-binding protein» (IRBP)	Uvéite
Arrestine rétinale	Uvéite
Myéline	EAE/Sclérose en plaque
«myelin oligodendrocyte glycoprotein» (MOG)	EAE/Sclérose en plaque
Protéine protéolipidique (PLP)	EAE/Sclérose en plaque
Transaldolase	EAE/Sclérose en plaque
«islet antigen 2» (IA-2)	Diabète de type I
Transaldolase	Diabète de type I
ADN simple brin + La	LES

EAE, encéphalo- myélite auto-immune expérimentale; LES, lupus systémique érythémateux.

Ainsi donc, plusieurs auto-antigènes se révèlent être capables d'induire la migration de Dc immatures, cellules dont le rôle principal est de présenter des antigènes aux autres cellules immunitaires. Il se pourrait donc que certains auto-antigènes, libérés dans le milieu lors de dommage cellulaire, puissent induire le recrutement de Dc et de cellules immunitaires exprimant les récepteurs chimiotactiques appropriés. Les propriétés chimiotactiques de ces auto-antigènes mèneraient alors à: (1) une augmentation de l'infiltration cellulaire dans le tissu endommagé, (2) une amplification de la réponse pro-inflammatoire et (3) une ingestion et une présentation

préférentielle des auto-antigènes par les Dc immatures. Ces conditions pourraient mener, chez des individus susceptibles, au développement ou à l'amplification d'une réponse auto-immune et, ultimement, à une maladie auto-immune.

5. Pathophysiologie de la Scl

La Scl est une maladie extrêmement complexe et il n'existe à ce jour aucune hypothèse pour expliquer tous les aspects de sa pathogénèse. Néanmoins, il est clairement établi que des dérèglements fondamentaux au niveau de trois types cellulaires sont intimement liés aux manifestations pathogéniques et cliniques de la maladie. Ces trois types cellulaires sont : 1) les cellules endothéliales, 2) les cellules mononucléées et 3) les fibroblastes. Ensemble, ces cellules contribuent aux changements pathophysiologiques majeurs observés chez la Scl : 1) altération de la microvasculature (hyperréactivité vasculaire, oblitération de la lumière au niveau des capillaires), dérégulation des réponses immunitaires cellulaires et humorales (infiltration de cellules mononucléées dans les tissus, production d'auto-anticorps) et 2) accumulation progressive de MEC dans les tissus menant à la fibrose cutanée et viscérale. La figure 4 résume la pathogénèse de la Scl : une exposition à un agent étiologique encore inconnu, dans un contexte de susceptibilité génétique, entraîne des dommages au niveau des cellules endothéliales et une infiltration de cellules mononucléées dans les tissus résultant en une hyperréactivité des fibroblastes et en une fibrose des tissus. Bien qu'il soit possible qu'un type cellulaire en particulier soit isolément responsable de l'apparition de la Scl, il est plus probable que cette maladie soit le résultat d'anomalies au niveau des interactions de ces trois types de cellules.

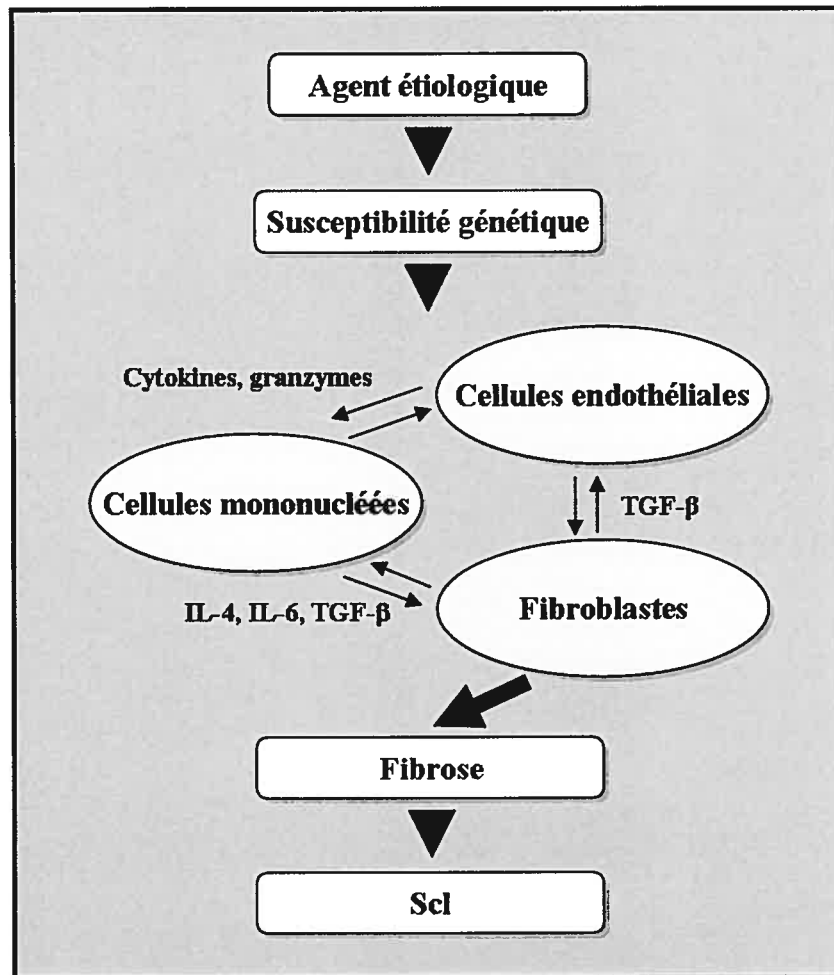


Figure 4. Résumé de la pathogénèse de la sclérose systémique

5.1. Cellules endothéliales

L'endothélium vasculaire tapisse la surface la plus interne des vaisseaux sanguins et sa fonction première est de réguler les phénomènes de vasomotricité et d'hémostase. Ce tissu semi-perméable gère également l'adhésion et la migration transendothéliale des cellules du système immunitaire.

Les dysfonctions vasculaires sont parmi les manifestations cliniques les plus précoces de la Scl. Ces dysfonctions ont pour origine une dégénérescence progressive de

l'endothélium vasculaire (248). En effet, les cellules endothéliales présentes dans les lésions cutanées sclérodermiques perdent progressivement leur intégrité et une destruction complète de ces cellules est même observée dans les lésions cutanées de la phase tardive de la maladie (219). De plus, les patients sclérodermiques possèdent des niveaux systémiques élevés de marqueurs de dommage vasculaire tels le facteur de von Willebrand (249;250), la thrombomoduline (251), l'enzyme de conversion d'angiotensine (252) et l'endothéline-1 (253;254). La dégénérescence des cellules endothéliales contribue à accroître la perméabilité vasculaire et entraîne la formation d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire (37).

Parmi les causes possibles de la dégénérescence de l'endothélium vasculaire dans la Scl, on retrouve les anticorps anti-cellules endothéliales (AECA) et des facteurs solubles cytotoxiques comme le granzyme A et les cytokines pro-inflammatoires.

Les AECA sont une famille hétérogène d'auto-anticorps réagissant contre différents antigènes présents à la surface des cellules endothéliales (255). Il a été démontré que ces anticorps, présents chez 28 à 54 % des patients avec Scl (8;200), peuvent entraîner une réponse cellulaire cytotoxique («antibody-dependent cellular cytotoxicity», ADCC) et causer l'apoptose des cellules endothéliales sur lesquelles ils se lient (9;256).

La granzyme A est une protéase sécrétée par les LT cytolytiques. Dans la Scl, cette enzyme se retrouve dans les lésions cutanées et il a été démontré *in vitro* qu'elle peut causer la lyse des cellules endothéliales (257).

De récentes études suggèrent que l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires serait un des premiers, sinon le premier, évènement pathogénique à survenir lors de la

Scl (205;220). Les dommages au niveau de l'endothélium initieraient l'activation des cellules endothéliales et l'expression par ces cellules de molécules d'adhésion qui, à leur tour, entraîneraient la migration de cellules mononucléées dans les tissus périvasculaires. Les cellules mononucléées se mettraient alors à sécréter des cytokines qui amplifieraient les dommages causés aux cellules endothéliales, perpétuant ainsi le cycle inflammatoire (258;259).

5.2. Cellules mononucléées

La Scl est considérée comme une maladie auto-immune pour deux raisons majeures :

1) parce qu'il y a présence, chez les patients, d'une réponse immunitaire acquise soutenue sans que l'on puisse détecter de façon constante la présence d'un antigène du non-soi et 2) parce que dans plus de 90 % des cas, il y a présence d'auto-anticorps en circulation dans le sang (3;184) (pour discussion détaillée sur les auto-anticorps, voir Chapitre 3).

L'inflammation est un phénomène précoce et prédominant au cours de la Scl. Les études sur les biopsies cutanées de patients montrent que l'infiltration de cellules mononucléées précède la fibrose et que l'ampleur de cette infiltration corrèle généralement avec le degré d'épaississement de la peau (260;261).

Les monocytes sont parmi les premières cellules à migrer dans les tissus. Ces cellules sont détectées dans les biopsies cutanées prises à la phase très précoce de la Scl, alors qu'à ce stade, les lymphocytes sont présents en quantités moins importantes (262). Les monocytes sont également présents tout au long de la réponse inflammatoire, leur nombre excédant parfois celui des lymphocytes dans les biopsies

cutanées où l'inflammation est sévère (263). Il est donc probable que ces cellules jouent un rôle important, non seulement au stade précoce, mais également au stade aigu de la maladie. Cette hypothèse est particulièrement intéressante parce qu'elle implique la participation de l'immunité innée au développement de la Scl.

Bien que les monocytes soient plus abondants très tôt dans la Scl, il est clair que dans les phases subséquentes de l'inflammation, les cellules prédominantes dans les tissus sont les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ activés (HLA classe II positifs) (262). Les biopsies cutanées montrent une majorité de LT $CD4^+$ (264;265) alors que les LT $CD8^+$ sont plus abondants dans les lavages bronchoalvéolaires (BAL) (266), ce qui suggère que les mécanismes d'immunité cellulaire sont organe dépendant dans cette maladie. Il a été démontré que les LT $CD4^+$ présents dans la peau des patients ont un répertoire de TCR restreint, indiquant que ces lymphocytes proviennent d'expansions clonales en réponse à un antigène (267). L'identité du ou des antigènes impliqués reste cependant à déterminer. Une étude récente suggère toutefois que certains auto-antigènes, notamment la topo I, pourraient être à l'origine d'une expansion clonale des LT chez certains patients atteints de Scl (268).

Les LT présents dans les lésions sclérodermiques montrent un profil de sécrétion de cytokines pro-fibrotiques. En effet, ces cellules synthétisent beaucoup d'IL-4, reconnue pour stimuler la production de collagène par les fibroblastes, et très peu d'interféron- γ (INF- γ), reconnu pour inhiber la fibrose (269-271). Une étude approfondie des gènes exprimés par les LT $CD8^+$ présents dans les BAL des patients avec Scl montre que ces cellules exhibent un patron d'expression génétique pro-fibrotique: augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'activation des

fibroblastes («fibroblast growth factor» (FGF), «insulin-like growth factor» (IGF), IL-13), dans la production de MEC («membrane-type 1 matrix métalloproteases» (MT1-MMP) ainsi que dans l'activation de TGF- β latent (intégrines β 6) (272).

L'expansion et la migration dans les tissus d'une sous-population de LT profibrotiques pourraient donc initier la fibrose dans la Scl. Plusieurs études soutiennent cette hypothèse. Par exemple, il a été démontré que des clones de LT provenant de lésions sclérodermiques produisent des cytokines qui peuvent promouvoir la sécrétion de collagène *in vitro* (265). Des études par hybridation *in situ* ont également mis en évidence que les fibroblastes qui produisent en grande quantité des procollagènes de types I et III sont généralement adjacents aux zones infiltrées par les LT (273;274), suggérant une association directe entre l'infiltration par les LT et l'augmentation de la production de MEC.

Bien que la majorité des lymphocytes détectés dans les lésions sclérodermiques soient des LT, les LB sont également présents. Ces cellules, responsables de la production d'anticorps, sont activées de façon chronique dans la Scl (275;276). L'hyperactivation polyclonale des LB entraîne une hypergammaglobulinémie et une sécrétion d'auto-anticorps chez les patients souffrant de cette maladie (260;277). Une anomalie intrinsèque aux LB pourrait être à l'origine de leur hyperactivation. Il a en effet été démontré que les LB de patients avec Scl surexpriment CD19 (237), une glycoprotéine de surface cellulaire régulant la sensibilité du seuil d'activation de ces cellules (278). Chez la souris, une surexpression de CD19 entraîne une baisse du seuil d'activation chez les LB, résultant en une production spontanée d'auto-anticorps (278). Cette anomalie pourrait expliquer le bris de tolérance périphérique et

la production d'auto-anticorps par les LB dans la Scl. Cependant, contrairement à la souris, la présence de LT auto-réactifs activés semble nécessaire à la production d'auto-anticorps par les LB chez l'humain (279).

Les résultats récents présentés plus haut ouvrent la porte à un nouveau modèle liant directement les LB au bris de tolérance systémique dans la Scl. Dans ce modèle, une inflammation initiée par l'infiltration de monocytes et de LT activés dans les tissus serait suffisante pour induire une hyperactivation des LB. L'activation chronique de ces cellules entraînerait la présentation d'auto-antigènes, ce qui provoquerait l'activation de LT auto-réactifs et amplifierait la réponse auto-immune. Une réponse auto-immune soutenue ainsi qu'une production massive de cytokines pro-fibrotiques, telles l'IL-6, le TGF- β et l'IL-4, résulteraient ultimement en une fibrose des tissus (280). Ce modèle, dans lequel les LB joueraient un rôle clé dans la pathogénèse de la Scl, est soutenu par de récentes données obtenues chez la souris. En effet, chez des souris développant spontanément une condition similaire à la Scl, une déplétion de la majorité des LB dès la naissance provoque une diminution marquée de la production d'auto-anticorps et de la fibrose cutanée (281). Il est intéressant de noter que, chez des souris adultes ayant déjà développé la maladie, la déplétion de la majorité des LB n'affecte ni la production d'auto-anticorps, ni la fibrose cutanée (281). Ces données suggèrent que les LB sont surtout impliqués dans l'initiation de la Scl plutôt que dans le maintien de la maladie.

Ainsi donc, les LB pourraient jouer un rôle déterminant dans le développement de la Scl en contribuant directement au bris de la tolérance au soi et à l'initiation de la réaction auto-immune.

5.3. Fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules du tissu conjonctif responsables de la sécrétion des composantes de la MEC, notamment le collagène. Ces cellules jouent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus ainsi que dans le phénomène de cicatrisation. Lors d'une blessure, les fibroblastes migrent vers la plaie, prolifèrent et synthétisent de la MEC jusqu'à ce que le manque de substance ait été comblé. Plus de la moitié des fibroblastes présents dans la plaie se différencient alors en myofibroblastes, des cellules caractérisées par la présence de myofibrilles contractiles au sein de leur cytoplasme. Ces cellules contractent la plaie, diminuant sa surface et facilitant ainsi sa fermeture. Après la complétion de la cicatrisation, la majorité des fibroblastes et myofibroblastes entrent en apoptose et laissent place au tissu fonctionnel.

Au cours de la Scl, les fibroblastes synthétisent en excès plusieurs composantes de la MEC qui s'accumulent de façon désordonnée dans les tissus et cause la fibrose (282;283). Parmi les composantes sécrétées en excès, on retrouve du collagène de type I, III, V, VI et VII, de la ténacine, certains protéoglycanes, de la fibronectine, de la laminine et de la fibrilline-1 (282;284-288).

Il est encore incertain si cette hyperactivation des fibroblastes dans la Scl est due à une dérégulation du processus normal de cicatrisation, conséquence d'une production excessive et soutenue de cytokines pro-fibrotiques, ou d'une anomalie intrinsèque aux fibroblastes, comme par exemple une altération au niveau de la régulation de certains gènes impliqués dans la synthèse de composantes de la MEC.

Les cellules mononucléées et les cellules endothéliales présentes dans les lésions sclérodermiques sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-fibrotiques comme le TGF- β , l'IL-6, l'IL-4, et le «connective tissue growth factor» (CTGF) (275;289-294). Ces cytokines stimulent la production de collagène par les fibroblastes présents dans les lésions et recrutent les fibroblastes périphériques (259). Elles induisent également la production de TGF- β , d'IL-6, d'IL-8, de CTGF et de «platelet-derived growth factor » (PDGF) par les fibroblastes (295). Cette production de cytokines par les fibroblastes accroît la synthèse de MEC de manière autocrine, amplifiant ainsi la cascade fibrotique.

Le TGF- β joue un rôle clé dans l'initiation de la fibrose dans la Scl. Il induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, des cellules ayant une capacité accrue à produire du collagène (296). Les myofibroblastes abondent dans les lésions sclérodermiques et sont en grande partie responsables de la surproduction de collagène dans les tissus (297-299). Le TGF- β est également la cytokine qui initie la production de CTGF par les fibroblastes (300). Or, il a été démontré que le CTGF est nécessaire au maintien de la production de collagène par ces cellules (301).

Ainsi donc, un relâchement soutenu de cytokines pro-fibrotiques par les cellules endothéliales et les infiltrats de cellules mononucléées pourrait initier une production chronique de MEC par les fibroblastes qui résulterait ultimement en fibrose des tissus.

Des altérations phénotypiques propres aux fibroblastes présents chez les patients avec Scl pourraient également contribuer à la persistance de leur activation.

Une synthèse accrue de MEC par les fibroblastes est intimement liée à une dérégulation de l'expression des gènes codants pour les composantes de cette matrice. Or, plusieurs altérations dans les voies de signalisation régulant l'expression de ces gènes ont été rapportées chez les fibroblastes sclérodermiques, notamment dans les voies régulant la synthèse du collagène de type I. Le TGF- β , par l'entremise des molécules de signalisation intracellulaire Smads 2, 3 et 4 et des facteurs de transcription Sp1 et CBP/p300, régule l'expression du gène codant pour le collagène de type I (302;303). Comparativement aux fibroblastes normaux, les fibroblastes provenant de patients avec Scl expriment plus de récepteurs de TFG- β à leur surface (304), ont des niveaux de phosphorylation accrus de Sp1 et Smad 2 (305), ont une expression déficiente de Smad 7, une Smad inhibant la durée et la magnitude de la réponse au TGF- β (306) et expriment davantage d'intégrine alpha(v)beta 5, une intégrine impliquée dans l'activation du TGF- β latent (307;308).

En plus des altérations liées à régulation de la synthèse du collagène, les fibroblastes sclérodermiques produisent moins de collagénase, une métalloprotéinase impliquée dans la dégradation de la MEC (309), produisent plus de «Tissue inhibitor of metalloproteinase 1» (TIMP-1), un inhibiteur de collagénase (298;310), ont une susceptibilité accrue à certains facteurs de croissance sécrétés par les cellules endothéliales (311) et sont plus résistants à l'effet inhibiteur de l'INF- γ sur la synthèse du collagène (312).

Les fibroblastes provenant de lésions sclérodermiques sont également plus résistants à l'apoptose induite par Fas (297). Il a été démontré que le TGF- β favorise la différenciation des fibroblastes normaux en myofibroblastes et que ces cellules

deviennent plus résistantes à l'apoptose (297). Or, comme il a été mentionné plus haut, les myofibroblastes abondent dans les lésions sclérodermiques (297-299). Une augmentation de la résistance à l'apoptose chez les fibroblastes sclérodermiques pourrait donc favoriser la sélection d'une sous-population de cellules possédant une capacité accrue à synthétiser de la MEC et à perdurer après la résolution de l'inflammation (297).

Il est intéressant de noter que la plupart des altérations phénotypiques citées plus haut se retrouvent également chez les fibroblastes présents dans la peau non sclérosée des patients avec Scl (290;299;313;314). Ces résultats suggèrent que l'altération du phénotype des fibroblastes précède le développement de la fibrose et pourrait être un facteur augmentant la susceptibilité d'un individu à la Scl.

Ainsi donc, les données les plus récentes suggèrent un modèle de pathogénèse de la Scl dans lequel l'évènement le plus précoce serait un dommage aux cellules endothéliales périvasculaires. Ce dommage provoquerait l'infiltration de cellules mononucléées dans les tissus et l'initiation d'un processus inflammatoire qui, suite à l'activation de LB auto-réactifs et à une expansion clonale des LT, deviendrait chronique. La sécrétion soutenue de cytokines pro-fibrotiques recruterait alors des fibroblastes qui perpétueraient un cycle pro-fibrotique résultant en une fibrose des tissus et, ultimement, au développement de la Scl (Fig. 5).

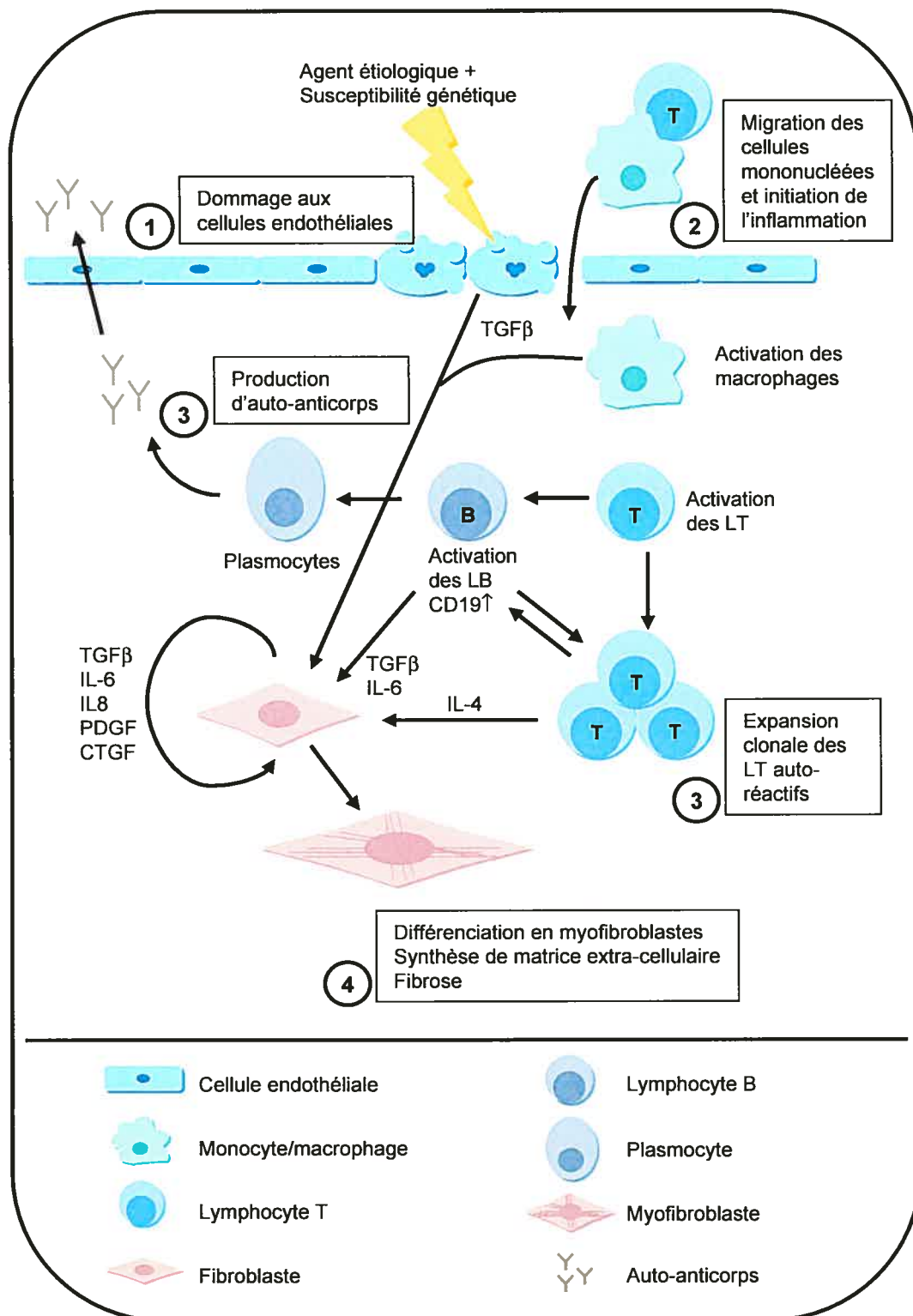


Figure 5. Modèle de la pathogénèse de la sclérose systémique

6. Rôle des auto-anticorps dans la pathophysiologie de la Scl

Plus de 90 % des patients atteints de Scl possèdent des auto-anticorps en circulation (3). Bien qu'un grand nombre d'études épidémiologiques ait permis d'établir la valeur diagnostique et pronostique de plusieurs de ces auto-anticorps, leur rôle dans la pathophysiologie de la Scl reste en grande partie inconnu. Ce trou béant dans la littérature découle probablement du fait que les auto-anticorps dans la Scl sont généralement perçus comme secondaires au développement de la maladie, i.e. comme un symptôme plutôt que comme des agents pathogènes actifs. De récents résultats remettent cependant en question le rôle uniquement passif de certains auto-anticorps dans la Scl et apportent une toute nouvelle perspective de leur rôle dans la maladie.

6.1. Outils diagnostiques et pronostiques

La valeur diagnostique et pronostique de plusieurs auto-anticorps dans la Scl est maintenant fermement établie. Leur grande valeur tient non seulement du fait que ces auto-anticorps soient fortement associés à des phénotypes distincts de la maladie, mais également au fait que leur présence précède généralement l'apparition de nouveaux symptômes (12;315).

Parce qu'ils sont spécifiques à la maladie et présents chez 80 à 85 % des patients sclérodermiques (3), les anti-topo I, les AAC et les anti-ARNP I et III sont les auto-anticorps les plus souvent testés lors d'études sérologiques. Ces trois ANA ont une grande valeur pronostique. Par exemple, la présence d'anti-topo I est fortement associée à la dScl, à une atteinte cutanée plus sévère, à de la fibrose pulmonaire et à une mortalité accrue, tandis que la présence de AAC est plutôt associée à la lScl, à

une atteinte cutanée limitée et à de l'hypertension pulmonaire (voir section 3 de l'introduction).

L'utilité d'un dépistage systématique des auto-anticorps dans la Scl est soutenue par un nombre croissant d'études qui montrent que cette pratique pourrait faciliter la gestion de la maladie (178). De nouveaux tests standardisés pour la détection des auto-anticorps les plus communs dans la Scl sont maintenant disponibles et permettront peut-être, dans un futur rapproché, l'établissement du profil sérologique complet de chaque patient atteint de la maladie.

6.2. Agents pathogènes

Le rôle des auto-anticorps dans la pathogénèse de la Scl, s'ils en ont un, est encore inconnu. Pour qu'un anticorps soit jugé pathogénique, on doit avoir la preuve définitive de sa contribution aux mécanismes pathophysiologiques menant au développement de la maladie (316). Les anti-ADN double-brin, présents chez les patients atteints de SLE, sont un exemple d'anticorps pathogénique. Il a en effet été démontré que ces anticorps contribuent directement à l'apparition de symptômes chez les patients, entre autres en formant des complexes d'immunoglobulines et de compléments qui se déposent dans les tissus, notamment les reins, et causent de l'inflammation (317-319).

Dans la Scl, certaines études ont montré que les AECA et les AFA peuvent influencer directement le phénotype de leur cellule cible, pouvant provoquer jusqu'à leur apoptose (voir section 3 de l'introduction). Ces auto-anticorps pourraient donc participer directement aux mécanismes pathogéniques menant au développement de

la maladie. Bien que d'un grand intérêt, ces résultats concernent des auto-anticorps qui ne se retrouvent que chez environ la moitié des patients et qui ne sont pas spécifiques à la Scl (chapitre 3).

Qu'en est-il des ANA spécifiques à la Scl, i.e. les anti-topo I, les AAC et les anti-ARNP I et III ? Jusqu'à maintenant, bien peu d'études se sont penchées sur leur potentiel pathogénique et aucune preuve de leur implication directe dans la pathogénèse de la maladie n'a été apportée. Conséquemment, ces auto-anticorps sont généralement considérés comme un épiphénomène de la maladie ou comme un marqueur de dommage cellulaire, plutôt que comme un agent pathogène (320).

L'hypothèse d'un rôle pathogénique des ANA dans la Scl est toutefois appuyée par un nombre croissant de résultats. De ces résultats ressortent cinq arguments majeurs en faveur d'un rôle potentiel des ANA dans la pathogénèse de la Scl (Tableau V).

Tableau VI. Arguments majeurs en faveur d'un rôle potentiel des ANA dans la pathogénèse de la Scl

1. Les ANA sont hautement spécifiques à la Scl.
 2. Les ANA sont mutuellement exclusifs et fortement associés à des phénotypes cliniques distincts de la Scl.
 3. Les ANA précèdent l'apparition des symptômes dans la Scl.
 4. Les titres sériques de certains ANA corrélerent avec l'activité et la sévérité de la Scl.
 5. Les ANA ont des caractéristiques d'immunoglobulines pathogéniques.
-

Premier argument: les ANA sont hautement spécifiques à la Scl. Comme il a été mentionné précédemment (voir section 3 de l'introduction), les anti-topo I, les AAC

et les anti-ARNP I et III sont spécifiques à la Scl. En effet, ces anticorps ne sont que très rarement présents chez des individus normaux ou atteints d'une autre connectivite (3;321;322). De plus, quoique les titres et la fréquence de ces anticorps soient influencés par des facteurs génétiques et géographiques, leur présence est universelle, quelle que soit la population de patients sclérodermiques étudiés (48;60;130;323-326). Il existe donc un lien étroit entre la présence de ces anticorps et le développement de la Scl.

Second argument: les ANA sont mutuellement exclusifs et sont fortement associés à des phénotypes cliniques distincts de la Scl. Les anti-topo I, les AAC et les anti-ARNP I et III ne coexistent quasiment jamais chez les patients sclérodermiques et chacun de ces anticorps est étroitement associé à une forme particulière de la maladie ainsi qu'à des atteintes viscérales sélectives (3;50;81;127;131) (voir section 3 de l'introduction). Par exemple, les AAC sont associés à la lScl, à une atteinte cutanée moins sévère, à une progression plus lente de la maladie et à un meilleur pronostic (83;86;130;323;326), tandis que les anti-topo I et les anti-ARNP I et III sont plutôt associés à la dScl, à une atteinte cutanée plus sévère, à une progression plus rapide de la maladie et à un moins bon pronostic (3;83;326).

L'association entre une atteinte viscérale particulière et la présence de certains ANA demeure un des aspects les plus intrigants de la Scl. Ainsi, la présence d'anti-topo I est associée à la fibrose pulmonaire mais pas à la crise rénale (11;90;92;93;326). Au contraire, la présence d'anti-ARNP I et III est associée à la crise rénale mais non à la fibrose pulmonaire (90;92;93). Les anti-topo I semblent protéger les patients de

l'hypertension artérielle pulmonaire (108), alors que cette atteinte s'avère être une complication fréquente chez les patients avec AAC (87).

Ces associations entre différents ANA et des atteintes viscérales spécifiques dans la Scl rappellent des associations similaires présentes dans le SLE. En effet, chez les patients lupiques, la présence d'anti-dsADN est associée à des glomérulonéphrites, tandis que la présence d'anti-Ro est plutôt associée à des blocs auriculo-ventriculaires congénitaux (327;328). Ces associations sont le résultat direct d'une pathogénécité sélective des anti-dsADN et des anti-Ro pour certains organes.

Un mécanisme similaire de ciblage préférentiel d'organes par les auto-anticorps pourrait être présent dans la Scl. Ainsi, certains ANA pourraient avoir des affinités plus élevées pour différents organes, causant une pathogénécité viscérale sélective, telle qu'observée dans la maladie.

Troisième argument: les ANA précèdent l'apparition des symptômes dans la Scl. Les ANA sont presque toujours présents dès la phase précoce de la Scl (157). Des études prospectives sur des patients atteints du PR démontrent même que les AAC, les anti-topo I et les anti-ARNP I et III peuvent précéder le développement de la Scl de plusieurs années (86;156;329). De plus, les patients avec PR exprimant des AAC ou des anti-topo I ont 63 fois plus de probabilité de développer la Scl que ceux ne possédant pas ces ANA (156).

Quatrième argument: Les titres sériques de certains ANA corrélerent avec l'activité et la sévérité de la Scl. Deux études ont récemment démontré que, chez certains

patients atteints de Scl, les titres sériques d'anti-topo I corrélaient avec l'activité et la sévérité de la maladie. Dans une première étude, faite sur une population de 59 patients avec la dScl, les titres sériques d'anti-topo I, déterminés par ELISA, corrélaient fortement avec la sévérité de la maladie, mesurée à l'aide du test de «total skin score» ou TSS ($r = 0.61$, $p < 0.001$) (12). De plus, la moyenne des titres sériques d'anti-topo I est plus élevée chez les patients avec une maladie active (présence d'inflammation et progression de la fibrose) versus les patients avec une maladie inactive (absence d'inflammation et de progression de la fibrose) (12). Un des résultats les plus marquants de cette étude découle d'un suivi longitudinal fait sur 11 patients. En effet, il a été démontré que chez 8 de ces 11 patients, les titres d'anti-topo I fluctuent en parallèle avec le TSS et, chez certains patients, une augmentation des titres sériques d'anti-topo I précède même une augmentation du TSS (12). Ces données supportent une étude précédente qui montre que les patients slérodermiques qui cessent d'exprimer des anti-topo I dans leur sérum voient une amélioration de leur fonction pulmonaire et de leur survie, comparativement aux patients dont les titres sériques d'auto-topo I sont maintenus (13).

Ces observations sont en accord avec un des critères définissant les anticorps pathogéniques, c'est-à-dire que «le retrait des anticorps pathogéniques devrait se traduire par une amélioration de la maladie» (330).

Il est à noter qu'une telle corrélation entre les titres sériques d'auto-anticorps et l'activité et/ou la sévérité de la Scl n'a encore été démontrée que pour les anti-topo I. L'établissement récent d'un test ELISA standardisé pour l'évaluation des titres

sériques d'anti-ARNP III devrait faciliter des études similaires chez les patients exprimant ces auto-anticorps (163).

En ce qui concerne les AAC, la lente progression de la maladie ainsi que l'apparition très tardive des symptômes expliquent peut-être qu'aucune corrélation entre les titres sériques d'AAC et l'activité et/ou la sévérité de la Scl n'ait encore été démontrée.

Cinquième argument: les ANA ont des caractéristiques d'immunoglobulines pathogéniques. Comme tout autre anticorps pathogénique, les ANA: 1) résultent d'une réponse immunitaire LT-dépendante dirigée contre un antigène spécifique, 2) ont des titres sériques élevés, 3) subissent une commutation isotypique d'IgM à IgG à mesure que la réponse immunitaire évolue, et 4) mûrissent en IgG ayant une affinité accrue pour l'antigène de départ (113;125;316;320;331-335).

Une des caractéristiques clés des anticorps pathogéniques est leur capacité à bloquer la fonction moléculaire de leur cible, généralement en se liant à un domaine fonctionnel. Or, les anti-topo I inhibent la relaxation de l'ADN (336), les anti-ARNP I et III inhibent la transcription de l'ARN (92) et les AAC perturbent la mitose cellulaire (337).

Bien que les évidences présentées plus haut soutiennent l'hypothèse d'un rôle pathogénique des ANA dans la Scl, elles le font de manière indirecte et montrent à quel point des études s'adressant directement à cette question sont nécessaires.

Résultats

Objectifs généraux de la thèse

Cette thèse avait pour but d'évaluer le potentiel pathogénique des auto-anticorps, plus particulièrement des ANA, dans la Scl. En premier lieu, nous voulions déterminer si la présence de certains ANA étaient associés à celle d'AFA, des auto-anticorps capable d'induire l'activation des fibroblastes, chez les patients sclérodermiques. Par la suite, nous voulions déterminer si les ANA pouvaient, à la manière des AFA, interagir directement avec la surface de certains types cellulaires. Finalement, nous voulions caractériser les mécanismes par lesquels la liaison de certains ANA à la surface de cellules pouvait contribuer à la pathogénèse de la Scl.

Article #1: Liaison directe des auto-anticorps anti-topoisomérase I à la surface des fibroblastes chez les patients atteints de sclérose systémique.

Article publié dans Arthritis & Rheumatism : 50, 3265-74, 2004

Présentation de l'article #1:

Plus de 90 % des patients atteints de Scl produisent des auto-anticorps (voir section 3 de l'introduction). Ces auto-anticorps, pour la plupart fortement spécifiques à la maladie, sont étroitement associés à des regroupements de manifestations pathophysiologiques et cliniques précis. Bien que leur utilité comme outil de diagnostic et de pronostique soit largement reconnue, le rôle de ces auto-anticorps dans la pathogénèse de la maladie demeure controversé.

En 2002, deux groupes de recherche indépendants décrivent la présence, chez des patients sclérodermiques, d'auto-anticorps capables de lier la surface des fibroblastes, les AFA, et d'initier des altérations phénotypiques chez ces cellules (5;7). Ces résultats suggéraient une possible implication des AFA dans des mécanismes liés à la pathogénèse de la Scl, d'où leur intérêt.

L'étude présentée dans cet article avait pour but de déterminer la prévalence des AFA chez les patients atteints de Scl, ainsi que chez des patients atteints de d'autres maladies, et d'examiner les possibles corrélations entre la présence des AFA et des ANA spécifiques à la maladie. Les résultats dignes de mention rapportés dans cet article sont que :

1. Les AFA sont plus communs dans la Scl (26 %) que dans toute autre maladie testée.
2. La présence d'AFA corrèle étroitement avec celle d'ANA anti-topo I chez les patients sclérodermiques.

3. Les IgG anti-topo I purifiés à partir de sera de patients sclérodermiques AFA positifs lient la surface des fibroblastes.

Les résultats présentés dans cet article montrent pour la première fois que les anti-topo I, des ANA spécifiques à la Scl, ont le potentiel, par l'entremise de leur liaison à la surface des fibroblastes, de jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie.

Contribution des auteurs à l'article #1:

- J.H. :** élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.
- I.C. :** élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique des résultats expérimentaux.
- M.T. :** élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique des résultats expérimentaux.
- Y.R. :** élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.
- J.-L. S. :** élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.

Article #1: «Direct Binding of Anti-Topoisomerase I Autoantibodies to the Cell Surface of Fibroblasts in Patients With Systemic Sclerosis»

Authors: Jill Hénault, Mélanie Tremblay, Isabelle Clément, Yves Raymond and
Jean-Luc Senécal

Jill Hénault, MSc, PhD candidate, Mélanie Tremblay, BSc, MSc candidate, Isabelle Clément, MSc, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine

Autoimmunity Research Laboratory, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Supported by grant MOP-43852 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research, and by studentships (JH, MT) from Sclérodermie-Québec.

Running head: Anti-fibroblast autoantibodies in SSc.

Address correspondence and reprint requests to:

Jean-Luc Senécal, MD
Autoimmunity Research Laboratory
Notre-Dame Hospital CHUM
1560 Sherbrooke East
Montreal QC H2L 4M1
Canada
Phone : 514-890-8000 ext. 27131
Fax : 514-412-7672
E-mail : [REDACTED]

ABSTRACT

Objective. Fibroblasts play a crucial role in the development of systemic sclerosis (SSc), and anti-fibroblast antibodies (AFAs) capable of inducing a proinflammatory phenotype in fibroblasts have been detected in SSc sera. In this study, we examined the prevalence of AFAs in SSc and other diseases, and the possible correlation between AFAs and known antinuclear antibody specificities in SSc patients.

Methods. Sera from 99 patients with SSc, 123 patients with other autoimmune and non autoimmune diseases, and 30 age and gender-matched healthy controls were examined. AFA prevalence was assessed by flow cytometry and further characterized by indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. Anti-topoisomerase I (anti-topo I) from SSc sera were purified by affinity chromatography on topo I.

Results. AFAs were more common in SSc patients (26%) than in any other diseases studied. The presence of AFA was significantly associated with pulmonary involvement and death. SSc AFA positive sera bound to all human and rodent fibroblasts tested but not to human primary endothelial or smooth muscle cells. All SSc AFAs strongly reacted with topo I by ELISA and immunoblotting. The binding intensity of SSc AFAs correlated strongly with reactivity against topo I on immunoblots of fibroblast extracts, and with the immunofluorescent pattern typical of anti-topo I on permeabilized cells. Total IgGs and affinity-purified anti-topo I from AFA positive SSc sera were found to react with the surface of unpermeabilized fibroblasts by flow cytometry, and by immunofluorescence and confocal microscopy. **Conclusion.** This is the first report establishing that AFAs in SSc are strongly correlated with anti-topo I and,

furthermore, that anti-topo I themselves display AFA activity by reacting with determinants at the fibroblast surface.

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by excessive extracellular matrix deposition, fibrosis and vascular obliteration in connective tissues of the skin, lungs, gastrointestinal tract, heart, and kidneys (1). Following a still undefined initial event, mononuclear cells such as lymphocytes and monocytes are recruited into connective tissues. The subsequent release of inflammatory cytokines leads to fibroblast activation, collagen accumulation and tissue hypoxia (2). Disease manifestations are variable, ranging from limited cutaneous SSc with slow visceral progression to diffuse cutaneous SSc with rapid visceral involvement (3).

One of the hallmarks of SSc is the presence in patient sera of autoantibodies against a variety of nuclear proteins, i.e. antinuclear autoantibodies or ANAs. The best known ANAs associated with SSc include anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I) antibodies, anticentromere (ACA) antibodies and anti-RNA polymerase III antibodies. These ANAs have been associated with different clinical manifestations and various degrees of SSc severity. For example, anti-topo I and anti-RNA polymerase III antibodies are usually associated with diffuse SSc (4,5) whereas ACA are detected predominantly in patients with limited disease (3, 4-6). Furthermore, anti-topo I antibodies are strongly associated with pulmonary fibrosis in SSc (3,7). However, the pathophysiological explanation for the strong association between particular ANAs and specific SSc subsets has yet to be unraveled.

Besides these well characterized ANAs, many other autoantibodies have been described in SSc, in particular those capable of recognizing cell surfaces. Anti-fibroblast antibodies (AFAs), anti-endothelial cell antibodies and anti-lymphocyte antibodies have all been reported in SSc (8-14). Recently, AFAs have been found to be closely associated with SSc (10) and evidence was presented on their putative effects in promoting fibroblast activation into a pro-inflammatory state (9, 10).

In the present study, we examined the prevalence of AFAs in SSc and other diseases, and the possible correlation between AFAs and known ANA specificities in SSc patients. Our results confirm the presence of AFAs in a subset of SSc patients. We found that AFA positive sera did not bind primary endothelial nor smooth muscle cells. Furthermore, a striking correlation was found between the fibroblast binding activity of these AFAs and the presence of anti-topo I in SSc sera. Finally, we demonstrate for the first time the direct binding of affinity-purified anti-topo I autoantibodies from SSc patients to the fibroblast surface.

MATERIALS AND METHODS

Patient population. Ninety nine SSc patients (83 women and 16 men; mean \pm SD age: 49.5 ± 12.7) were selected randomly out of a French Canadian cohort of 309 SSc patients diagnosed between April 1984 and September 1999 at the Connective Tissue Diseases and Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital in Montreal (3). All patients were classified as fulfilling American College of Rheumatology SSc criteria (15). Patients were also categorized into one of four SSc subsets using previously

described definitions (3, 16) and based on the extent of sclerodermatous skin involvement: diffuse (must include trunk involvement, n=14); intermediate (must include upper extremities proximal to metacarpophalangeal joints without trunk involvement, n=33); limited (skin involvement restricted to sclerodactyly, plus Raynaud phenomenon, n=44); and normal skin (n=8). Frequencies of target organ involvement at diagnosis and mortality data were also determined as described in detail in our prospective cohort study of SSc (3). Sera were obtained at the time of SSc diagnosis, i.e. prior to treatment, coded and stored at -80°C. Control sera were collected as previously described from gender and age-matched patients with other autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, n=30; rheumatoid arthritis, n=30), non autoimmune conditions (psoriatic arthritis, n=20; ankylosing spondylitis, n=23; osteoarthritis, n=20) and healthy individuals (n=30) (17).

Cell cultures. Human foreskin hTERT-BJ1 fibroblasts (Clontech, Palo Alto, CA) were cultured in DMEM with 20% medium 199 (Sigma, Saint-Louis, MO), 10% fetal bovine serum-TET and 100 µg/ml of gentamycin (Wisent, Saint-Bruno, Quebec, Canada). Mouse NIH 3T3 and rat RAT-2 embryonic fibroblasts (ATCC, Manassas, VA) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 100 µg/ml of gentamycin. Human embryonic lung WI-38 fibroblasts (ATCC) were grown in fibroblast basal medium (FBM) with 10% FBS and gentamycin. Normal human lung fibroblasts (NHLF), normal human dermal fibroblasts from adult and neonate were cultured in FBM with 2% FBS, 5 µg/ml of bovine insulin, 1 ng/ml of human fibroblast growth factor-B (hFGF-B), gentamycin and sulfate amphotericin-B. Primary fibroblast cells were used between passages 4 and 6. Human umbilical vein

endothelial cells, human microvascular endothelial cells from derm and lung were grown in endothelial basal medium with EGM-2MV (5% FBS, 0.1% insulin-like growth factor-1, 0.1% ascorbic acid, 0.4% hFGF-B, 0.1% human epidermal growth factor (hEGF), 0.04% hydrocortisone, 0.1% human vascular endothelial growth factor, 0.1% gentamycin). Human pulmonary artery smooth muscle cells were grown in smooth muscle basal medium to which was added the SmGM-2 bullet kit (5% FBS, 0.1% hEGF, 0.1% insulin, 0.2% hFGF-B and 0.1% gentamycin). All endothelial and smooth muscle cells and their respective media were from Cambrex (Walkerville, MD). Cells were grown at 37°C in air with 5% CO₂. Subculturing was achieved before confluency using trypsin and trypsin neutralizing solution (Cambrex).

Antibody purification. Human total IgGs were purified from sera by affinity chromatography using NAb Protein G Spin Chromatography Kit (Pierce, Rockford, IL), following manufacturer's instructions. Final IgG concentration was determined by Bradford dye-binding procedure (Bio-Rad, Hercules, CA) and varied from 2.0 to 11.9 µg/µL.

Human anti-topo I IgGs were purified from sera by affinity chromatography on immobilized topo I using Vivapure Epoxy Protein Coupling Kit (VivaScience, Hannover, Germany), following manufacturer's instructions. Final anti-topo I IgG concentration was determined using Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce) and varied from 3.6 to 8.3 ng/µl.

Flow cytometry. Adherent cells were detached with PBS/0.5% EDTA and washed with PBS. Cells were first incubated with 1 µg/mL goat IgG (Sigma) in PBS

to block non-specific binding sites. Cells were then incubated with human sera diluted 1:200 in PBS with 3% BSA or with mouse anti-CD51 IgG (Sigma) for 30 min. IgG binding was revealed with phycoerythrin-conjugated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted 1:50 or phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG γ -chain (Jackson) diluted 1:100. Cell permeability was assessed by addition of 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma). Fluorescence was detected on a FACScan and analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, San Jose, CA). The mean fluorescence intensity (MFI) of a reference from a positive serum pool was arbitrarily defined as a standard and assayed in each independent experiment. To adjust for interassay variability, the results of tested samples were normalized with respect to this positive reference value.

ELISA. Polystyrene 96-well plates (Immulon 2HB, Thermolab Systems, Franklin, MA) were coated with 350 ng of affinity-purified topo I (Immunovision, Springdale, AR) diluted in 0.05M Na₂CO₃/ NaHCO₃ pH 9.6 buffer for 1 h at 37°C. After washes with PBS/0.5% Tween-20, wells were blocked overnight at 37°C with PBS containing 2% FBS, 1% BSA and 0.5% Tween-20. Patient sera diluted 1:1000 in blocking buffer were incubated for 1 h at 37°C. Human IgG binding was revealed with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson) diluted 1:10000 in blocking buffer and o-phenylenediamine (Sigma) substrate diluted at 0.8 mg/ml in citrate buffer pH 6 and 0.006% H₂O₂. Reaction was stopped by 2 M H₂SO₄ and the optical density (OD) at 490 nm was read in a MRX revelation microplate-reader (Dynex, Chantilly, VA). ELISA samples were read in duplicate and subtracted from

a control well without antigen. OD values were normalized to a reference positive pool of sera added to each plate.

Electrophoresis and immunoblotting. NHLF cells were washed in PBS and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 1mM Na₃VO₄, 1% SDS). Proteins from cell lysates were quantitated using the Micro BCA Protein Assay (Pierce), following the manufacturer's instructions. Topo I and NHLF proteins were diluted in electrophoresis sample buffer (25 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.25% bromophenol blue). Proteins were separated on 8% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad).

Membranes were pre-incubated in blocking buffer (TBS/0.5% Tween-20/5% powdered skim milk) overnight at 4°C and then incubated with purified serum IgGs (10 μ g/mL), 1 h, at room temperature. IgG binding was detected using a horseradish peroxidase-coupled goat anti-human IgG γ -chain (Jackson) and the Super Signal West Pico chemiluminescence kit (Pierce). Mouse monoclonal IgM anti-human DNA topoisomerase I (BD) diluted 1:500 was used as a positive control.

Immunofluorescence and confocal microscopy. ANA fluorescent pattern detection was done as previously described (18). Briefly, WI-38 cells were grown on glass coverslips until 70% confluence. Cell monolayers were washed three times with cold PBS, fixed and permeabilized with methanol (5 min, -20°C), followed by acetone (2 min, -20°C). Fixed cells were first incubated with PBS/3% BSA for 10 min, and then incubated with human sera diluted 1:50 for 30 min. Antibody binding sites were revealed with a fluoresceinated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson).

For surface staining with human IgGs, WI-38 cells were detached with 0.125 mg/mL trypsin/EDTA. Cells were first incubated with 1 μ g/ μ l of goat IgG and then with 200 μ g/ml SSc total IgGs or 20 μ g/ml affinity-purified SSc anti-topo I IgGs. Mouse anti-CD51 IgG (Sigma) was used as a membrane marker. IgG binding was revealed with fluoresceinated goat anti-human IgG γ -chain (Jackson) and Cy3 goat anti-mouse IgG γ -chain (Jackson). Cells were cytopun (1200 X g, 5 min) onto glass slides and fixed with PBS/2% paraformaldehyde. Cells were then examined with a Zeiss 510 confocal laser microscope (Zeiss, Thornwood, NY), as previously described (19).

For competition studies with topo I, 25 μ g of purified topo I (Immunovision) was immobilized on Vivapure Epoxy Protein Coupling columns (VivaScience). Anti-topo I affinity-purified from two different AFA+ sera were incubated with the immobilized topo I, following manufacturer's instruction. Anti-topo I depletion was confirmed by immunoblotting on NHLF lysates. The anti-topo I depleted solution was then assayed for fibroblast surface binding by immunofluorescence as described above.

Statistical analysis. Comparison of the mean IgG levels between SSc and controls was performed using Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance and Dunn's multiple comparison test (20). Frequency comparison of AFA was done by Chi-square test. Correlation between OD and MFI values was validated by Pearson correlation test. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

AFAs are highly restricted to a subset of SSc and SLE patients. In a previous study, AFA were found to be present in SSc sera but not in sarcoidosis and healthy controls (10), suggesting that AFA could be restricted to SSc. We wanted to assess the frequency of AFA positive sera in our cohort of patients and healthy controls. Sera were screened for AFA by flow cytometry using unfixed WI-38 human lung fibroblasts. Permeable cells were positively stained with the nuclear marker 7-AAD and were gated out, thereby eliminating intracellularly-stained cells. Figure 1 shows representative results obtained with two SSc sera, one positive and one negative for AFA activity, and with a serum from a single normal control. An anti-human CD51 antibody was used as positive control (not shown).

Serum samples from patients with SSc (n=99), autoimmune and non autoimmune disease controls (n=123) and healthy controls (n=30) were screened as mentioned above and Figure 2 shows the distribution and titers of IgG AFA. High titers of AFA were present in sera from 26 of 99 (26%) SSc patients, using the set threshold of 10 SD above the mean value of age and gender-matched normal controls. High titers of AFA were also found in 5 (16.5%) SLE sera. None of the other control sera had AFA (Figure 2).

Comparison of the mean IgG AFA serum levels across the groups revealed a highly significant difference ($P<0.0001$). Specifically, the mean IgG AFA level was greater in SSc than in any control group ($P<0.05$), except SLE. Also, the frequency of high titers of IgG AFA was greater in SSc than in all control groups ($P<0.01$), except SLE. Finally, the mean IgG AFA level in the SSc patients with high titers of AFA

(n=26) was greater than in the other SSc patients (n=73) or any control group ($P<0.001$).

High AFA titers are present in limited, intermediate and diffuse SSc. A higher frequency of AFA in dSSc than in lSSc was previously reported (10). We wanted to determine if that was the case for the SSc patients in our study. High titers of IgG AFA were found with similar frequencies in limited, intermediate and diffuse SSc sera (27%, 30% and 38.5%, respectively, $P=0.8$). Mean AFA titers were not significantly different in these SSc subsets ($P>0.05$, by Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance; data not shown).

High AFA titers are associated with pulmonary involvement and death.

To determine if AFA+ were associated with specific SSc features, the frequency of various target organ involvement at diagnosis was compared between AFA+ and AFA- sera. On pulmonary function tests, a restrictive syndrome was significantly more frequent in AFA+ (n=8/23, 34.8%) than in AFA- patients (n=6/61, 9.8%, $P<0.005$, OR 5.8, 95% CI 1.7-19). Similarly, a DLCO below 60% of the normal predicted value was more frequent in AFA+ (n=14/27, 51.8%) than in AFA- patients (n=17/71, 22%, $P<0.02$, OR 3.4, 95% CI 1.35-8.7). The presence of pulmonary fibrosis (on radiogram or computerized scan of the chest) and/or a restrictive syndrome and/or a DLCO below 60% was also significantly more common in AFA+ (n=16/27, 59.2%) than in AFA- patients (n=21/71, 29.6%, $P=0.01$, OR 3.5, 95% CI 1.4-8.7). Finally, a significantly greater mortality rate was observed during follow-up among patients who were AFA+ at diagnosis (n=13/27, 48.1%) in comparison with AFA- patients (n=15/71, 21.1%, $P<0.02$, OR 3.47, 95% CI 1.35-8.9).

AFA+ sera bind neither primary endothelial nor smooth muscle cells. To assess whether the binding activity of AFAs from SSc sera was influenced by fibroblast origin, we screened AFA+ (n=25) sera on human primary fibroblasts from adult lung, adult and neonate dermis, and on the immortalized human fibroblast cell line hTERT-BJ1. Mouse NIH 3T3 and rat RAT-2 fibroblast cell lines were also tested. Results were compared with those obtained with the WI-38 cell line and were found to be qualitatively similar (data not shown). However, none of the AFA+ SSc sera tested had significant binding activity on three primary endothelial cell populations tested (human umbilical vein endothelial cells, human microvascular endothelial cells from derm and lung) nor on primary smooth muscle cells (data not shown), indicating a high specificity of AFAs for fibroblasts, independently of their origin.

Strong association between anti-topo I activity and AFA+ status in SSc. To further characterize SSc AFAs, we examined whether AFA status correlated with any specific fluorescent ANA staining patterns. SSc sera (AFA-, n=12; AFA+, n=25) were first screened for ANAs by indirect immunofluorescence on fixed WI-38 cells. Intriguingly, all AFA+ sera had strong nucleolar and nuclear granular diffuse staining reminiscent of an anti-topo I staining pattern (data not shown). A mouse monoclonal anti-topo I antibody used as control gave a similar nuclear staining pattern (data not shown). These results suggested that AFAs were associated with anti-topo I. Therefore, the presence of anti-topo I IgGs in each SSc serum sample was assayed by ELISA purified topo I. The mean anti-topo I reactivity was strikingly higher in AFA+ sera compared to AFA- sera ($P < 0.0001$, by Kruskal-Wallis analysis; data not shown).

To determine whether AFAs were contained in the IgG fraction of SSc sera, IgGs were purified from AFA- SSc (n=12), AFA+ SSc (n=25), and normal human sera (n=3) and tested for binding to lung fibroblasts by flow cytometry. The results obtained were the same as with unfractionated sera (data not shown), confirming that AFAs are mainly of the IgG isotype.

The IgGs purified from SSc sera were further tested for reactivity against topo I by immunoblotting. We found a complete correlation between IgG reactivity against denatured topo I protein and AFA status, as shown in Figure 3. In Figure 3a, it can be seen that IgGs from all AFA+ sera (n=25/25, 100%) reacted with topo I. To verify whether this association was maintained with cellular topo I, SSc IgGs were reacted against NHLF lysates. As shown in Figure 3b, all (n=25/25, 100%) IgG preparations from AFA+ sera reacted against a 95-100 kDa protein compared to 2 out of 12 (17%) AFA- sera. The monoclonal antibody against topo I used as positive control also reacted against a 95-100 kDa protein, confirming the presence of cellular topo I at this position. Again, these data demonstrated a strong association between the presence of anti-topo I IgGs and AFAs in SSc sera. Two IgG preparations from AFA- sera recognized a 95-100 kDa protein present in the fibroblast lysate but were negative for topo I recognition.

Contrarily to AFA+ SSc sera, none of the 5 AFA+ SLE sera tested by flow cytometry on WI-38 lung fibroblasts were positive for topo I recognition by immunoblotting or ELISA (data not shown). These results are in accordance with previous studies demonstrating the rarity of anti-topo I antibodies in SLE patients except in overlap syndromes (6, 21).

AFA strongly correlate with anti-topo I reactivity. The strong association between AFA+ status and the presence of anti-topo I in SSc sera prompted us to determine whether there was also a direct quantitative correlation between AFA binding and anti-topo I reactivity by ELISA. As shown in Figure 4, there was a striking and highly significant correlation between the AFA binding intensity and anti-topo I reactivity ($r=0.65$, $P<0.0001$), suggesting that anti-topo I IgGs may be directly responsible for fibroblast binding.

Cell surface localization of AFA binding sites on human lung fibroblasts.

Since topo I is a nuclear protein not normally present on the cell surface, we wanted to confirm the cell surface localization of AFA binding. The cellular binding patterns of IgG preparations from AFA+ SSc sera ($n=3$), AFA- SSc sera ($n=3$), and normal sera ($n=2$) were evaluated on living fibroblasts by double immunofluorescence and subsequently visualized by confocal laser microscopy. WI-38 fibroblasts were exposed to human IgGs, prior to any fixation or permeabilization of the cells. IgG binding patterns were revealed by a fluoresceinated anti-human antibody. Mouse anti-human CD51 and Cy3-conjugated anti-mouse antibodies were used as a cell surface marker. As shown in Figure 5a, fluorescence due to IgGs from AFA+ sera localized at the cell surface. The staining pattern of IgGs from AFA+ sera was dotted, suggesting a non-uniform distribution of the surface antigenic target. Only limited staining was observed on the surface of cells exposed to AFA- IgGs or normal human IgGs (Figure 5c and d, respectively). These results confirm that AFAs bind to the surface of fibroblasts.

Affinity-purified anti-topo I bind to the surface of fibroblasts. Taken together, results shown above strongly suggest that AFA activity in SSc sera is directly mediated by anti-topo I autoantibodies capable of recognizing a fibroblast surface antigen. Figure 6a confirms that anti-topo I IgGs, affinity-purified from two different AFA + SSc sera, reacted specifically against topo I by immunoblotting. The anti-fibroblast binding activity of these purified anti-topo I IgGs was then assessed by flow cytometry and immunofluorescence on WI-38 fibroblasts: anti-topo I IgG preparations were found to bind to the fibroblast surface by both techniques, Figure 5d and Figure 6b, respectively. A mouse monoclonal anti-human topo I antibody also reacted against the WI-38 cell surface by flow cytometry (Figure 6b). Immunofluorescence experiments demonstrated that competition with topo I completely abrogated binding to the cell surface of purified anti-topo I (data not shown), thus confirming the specificity of the anti-fibroblast binding activity of affinity-purified anti-topo I. These results clearly demonstrate that anti-topo I autoantibodies present in SSc sera are AFAs.

DISCUSSION

Until recently, autoantibodies associated with SSc were thought to have only a limited role in the pathogenesis of this disease and were mostly studied for their use as disease-specific markers. However, recent studies have shown that AFAs present in SSc sera can induce a proadhesive and proinflammatory phenotype in fibroblasts and can also be specifically internalized by these cells (9, 10). These findings suggest that the role of AFAs in SSc may be of a greater importance than previously thought.

Hence, the aim of this study was to further characterize the binding activity of autoantibodies from SSc sera on fibroblasts and to explore the association of these AFAs with major ANAs.

Using sera obtained at the time of diagnosis, we confirmed the presence of AFAs in SSc sera, as previously reported (10). Moreover, we found that AFAs were more common in SSc patients than in any autoimmune or non autoimmune control group studied, except SLE. Results of AFA assays were identical whether using unfractionated sera or purified IgGs. Also, AFA activity was highly fibroblast-specific, as no AFA binding to primary endothelial or smooth muscle cells was observed. In contrast, AFA+ sera bound to all seven fibroblast populations tested.

A striking and unexpected finding in our study was the perfect association between the presence of AFAs and anti-topo I antibodies in SSc sera. Such an association was not present in AFA+ SLE sera. All AFA+ sera from SSc patients recognized topo I by ELISA. AFA+ sera also stained nuclei of permeabilized WI-38 lung fibroblasts with an anti-topo I pattern by indirect immunofluorescence. Furthermore, all 25 IgG preparations from AFA+ SSc sera reacted by immunoblotting against both purified topo I and the topo I (95-100 kDa) (22) present in extracts from human lung fibroblasts. Two AFA- sera negative for topo I recognition did react against a 95-100 kDa protein present in cellular extracts. It is likely that this antigen was not topo I but a comigrating polypeptide, as previously reported (23).

AFA+ SSc sera were not only associated qualitatively with the presence of anti-topo I antibodies but their association was also quantitative, as shown by their

highly significant correlation with anti-topo I antibody levels (Figure 4). Furthermore, the strong association between AFA+ and pulmonary involvement as well as mortality in SSc was reminiscent of the associations reported by us and others for anti-topo I (3).

Because these results globally suggested that AFA activity in SSc sera might be directly due to anti-topo I autoantibodies, we affinity-purified anti-topo I IgGs from AFA+ SSc sera and tested them by flow cytometry and immunofluorescence. Our results show that anti-topo I IgGs from SSc sera as well as monoclonal anti-topo I antibodies can bind directly to the surface of WI-38 fibroblasts.

This is the first report establishing that AFAs in SSc are strongly correlated with anti-topo I and, furthermore, that anti-topo I themselves display AFA activity by reacting with determinants at the fibroblast surface. Because we did not affinity-purify anti-topo I from all 25 positive sera, and test them for binding to the fibroblast surface, we cannot exclude the possibility that, in some instances, the association between anti-topo I and AFA in SSc sera may be due to two distinct autoantibody populations. Further experiments are under way to examine this possibility.

Because topo I has a strict nuclear localization, and given that fibroblasts play a crucial role in the unregulated production of extracellular matrix components which leads to fibrosis in SSc (24, 25), our findings raise two fundamental questions. First, what is the molecular identity of the cell surface antigen recognized by anti-topo I? One possible explanation would be the presence of topo I itself at the fibroblast surface. Although some studies have provided evidence that intracellular autoantigens are exported to the cell surface by ectocytosis or during apoptotic processes (26-29),

the presence of topo I on the plasma membrane of normal human fibroblasts has, to our knowledge, never been reported. An alternative explanation would be that anti-topo I cross-react with an integral or a peripheral plasma membrane protein. Such a hypothesis is not without precedent since Diamond and coworkers have shown that a subset of anti-DNA antibodies cross-react with the NR2 glutamate receptor from neurons of the central nervous system in SLE (30). This report shows that it is possible for an autoantibody to a strict intranuclear autoantigen to cross-react with an unrelated cell surface antigen. Our results show that anti-topo I reactivity was specific for fibroblasts as no reactivity was observed against several endothelial and smooth muscle cell lines. This specificity may indeed point to cross-reaction with a fibroblast-specific protein on the cell surface. However, the molecular identity of the cell surface antigen recognized by anti-topo I remains to be determined.

The second question raised by our data is whether anti-topo I binding to the fibroblast surface perturb their function and contribute to SSc pathogenesis. This question is relevant in light of growing evidence showing a strong relationship between anti-topo I levels and severity of skin and pulmonary involvement as well as global disease activity in SSc (3, 7, 31-33). Although the role of the recently discovered AFAs in the pathogenesis of SSc is still unclear, results appear to point at their influence on the cellular activation state via direct interaction with an undefined fibroblast surface target (9, 10). Whether anti-topo I could perturb fibroblast functions by other pathways remains to be determined.

In summary, we have shown that AFA in SSc are strongly correlated with anti-topo I. Furthermore, anti-topo I themselves display AFA activity by reacting

with determinants at the fibroblast surface. We have now undertaken studies to define the molecular identity of these determinants, and also to examine mechanistically whether anti-topo I perturb fibroblast functions in SSc.

ACNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mr. Fernand Locas and Mrs. Gisèle Sarrazin-Locas, and to the Comité Fonds Sainte-Jeanne-d'Arc of the Dollard-Cormier Foundation for generous donations in support of our laboratory.

REFERENCES

1. Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
2. Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillevin L. Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects. *Ann Med Interne (Paris)* 2002;153:167-78.
3. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynaud JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, Raymond Y, Senécal JL. Predicting mortality in systemic sclerosis. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:154-67.
4. Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, Picillo U, Vatti M. Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol* 1986;13:911-6.
5. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31:196-203.
6. Weiner ES, Earnshaw WC, Senécal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:378-85.
7. Diot E, Giraudeau B, Diot P, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL et al. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest* 1999;116:715-20.
8. Brentnall TJ, Kenneally D, Barnett AJ, de Aizpurua HJ, Lolait SJ, Ashcroft R et al. Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. *J Clin Lab Immunol* 1982;8:9-12.
9. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum* 2002;46:1595-1601.
10. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1602-1613.
11. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol* 1996;106:491-7.
12. Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nasonov EL, Dueymes M, Piette JC, Youinou PY. Anti-endothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med* 1997;102:178-85.
13. Alderuccio F, Witherden D, Toh BH, Barnett A. Autoantibody to gp50, a glycoprotein shared in common between fibroblasts and lymphocytes, in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1989;78:26-30.
14. Herrmann K, Schaller J, Hausteil UF, Baldauf C, Kiessig S. Lymphocytotoxic autoantibodies in progressive systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1988;280:399-404.

15. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
16. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, Choquette D, Raymond Y, Senécal JL. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2001;44:735-6.
17. Senécal JL, Rauch J, Grodzicky T, Raynauld JP, Uthman I, Nava A, Guimond M, Raymond Y: Autoantibodies to human nuclear lamin B1 are strongly associated with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:1347-1353.
18. Senécal JL, Fortin S, Joyal F, Roussin A. A novel autoantibody to microfilament anchorage sites recognizes novel focal contact proteins. *J Clin Invest* 1987;80:778-785.
19. Dieudé M, Senécal JL, Rauch J, Hanly JG, Fortin P, Brassard N, Raymond Y. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum* 2002;46:2695-707.
20. Godfrey K. Comparing the means of several groups. In : Bailar JC III, Mosteller F, editors. *Medical uses of statistics*. Waltham (MA): NEJM Books; 1986.p.205-34.
21. Katsumi S, Kobayashi N, Yamamoto Y, Miyagawa S, Shirai T. Development of systemic sclerosis in a patient with systemic lupus erythematosus and topoisomerase I antibody. *Br J Dermatol*. 2000;142:1030-3.
22. Guldner HH, Szosteki C, Vosberg HP, Lakomek HJ, Penner E, Bautz FA. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein indentified as DNA topoisomerase I. *Chromosoma* 1986;94:132-8.
23. Hildebrandt S, Weiner ES, Senécal JL, Noell S, Earnshaw WC, Rothfield NF. Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): Analysis by gel diffusion, immunoblot and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:399-410.
24. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:187-99.
25. Le Roy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts "in vitro". *J Clin Invest* 1974;54:880-9.
26. Hsu TC, Lee TL, Tsay GJ. Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br J Rheumatol* 1997;36:1038-44.
27. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2002;56:456-69.
28. Hansen MH, Nielsen HV, Ditzel HJ. Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. *J Immunol* 2002;169:2701-11.

29. Clancy RM, Askanase AD, Kapur RP, Chiopelas E, Azar N, Miranda-Carus ME et al. Transdifferentiation of cardiac fibroblasts, a fetal factor in anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *J Immunol* 2002;169:2156-63.
30. DeGiorgio LA, Konstantinov K, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nature* 2001; 7:1189-1193.
31. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1074-1084.
32. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363-73.
33. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxford* 2003;42:534-40.

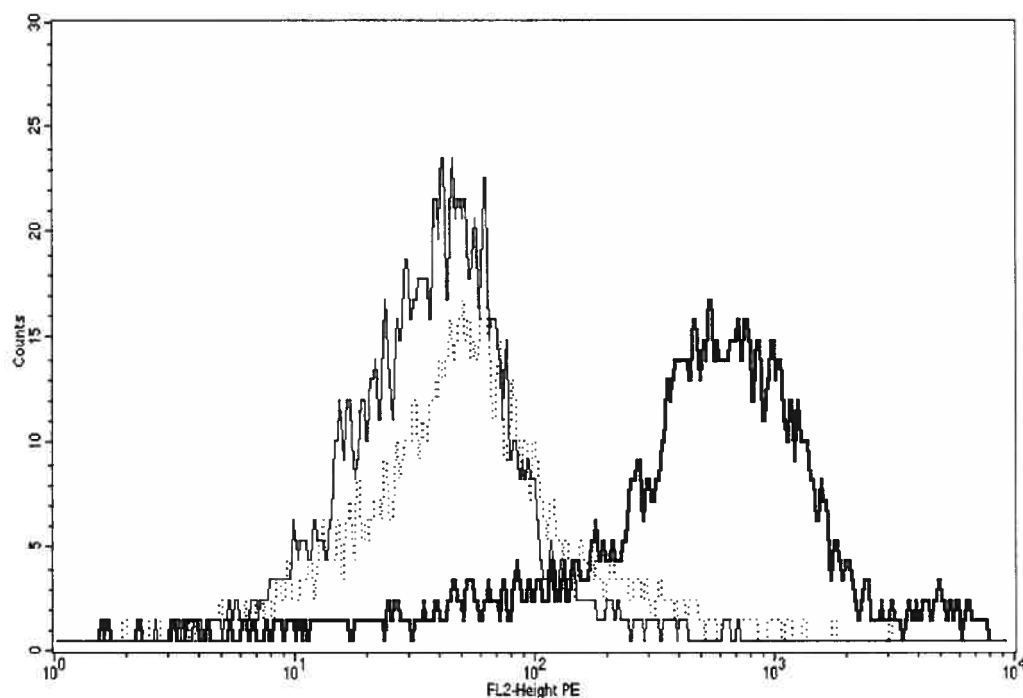


Figure 1. Flow cytometry analysis of anti-fibroblast antibodies (AFAs) from human sera on WI-38 fibroblasts. Data are presented as positive intact cell counts versus IgG-PE fluorescence intensity. Permeable cells have been gated out after vital staining with 7-AAD, as described under Materials and Methods. Representative results using an AFA+ (thick filled line) and an AFA- (dotted line) serum are shown. Normal human serum (thin filled line) was used as control. The AFA+ serum disclosed strong binding to WI-38 lung fibroblasts as shown by the shift to the right whereas AFA- serum disclosed no binding, similar to the normal control serum.

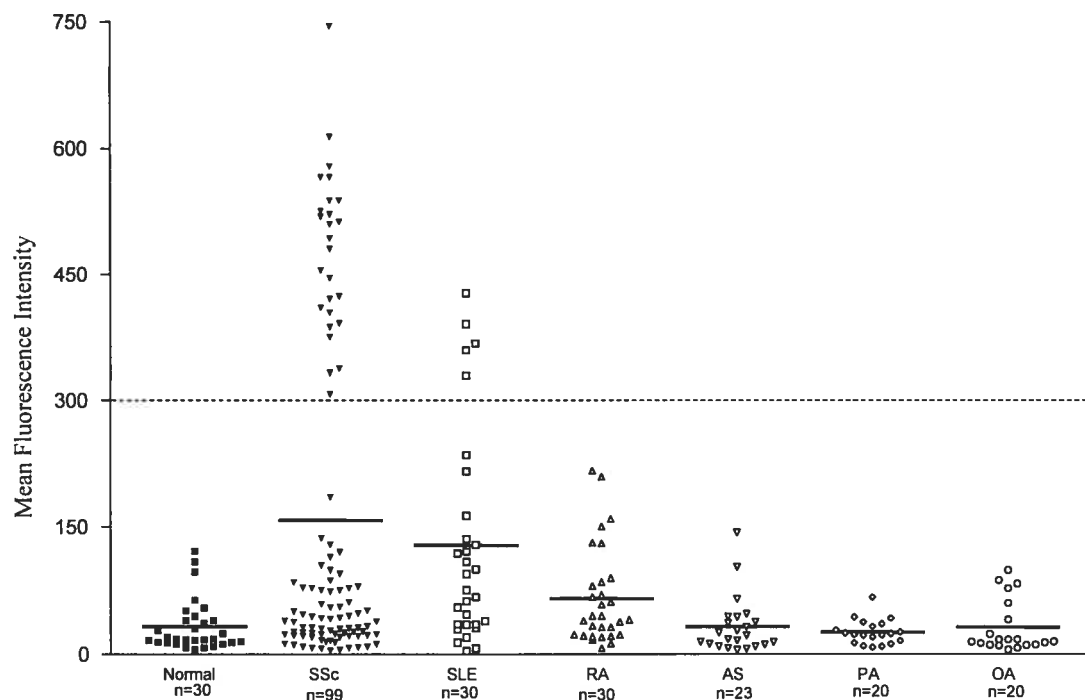


Figure 2. Distribution of IgG AFAs in systemic sclerosis (SSc) patients, and normal and disease controls by flow cytometry on WI-38 human lung fibroblasts. Disease controls included systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), psoriatic arthritis (PA), and osteoarthritis (OA) patients. Binding activity, determined as shown in Figure 1, is expressed as normalized mean fluorescence intensity (MFI), determined as described under Materials and Methods. All sera (n=252) were screened thrice and similar results were obtained. The horizontal dotted line defines a cut-off value, corresponding to 10 SD above the mean MFI of normal sera. Horizontal bars for each subset represent the mean. AFAs were present in sera from 26 of 99 (26%) SSc patients and in sera from 5 of 30 (16.5%) SLE patients. No AFAs were present in any of the other disease or normal controls. The mean IgG AFA levels in the SSc subset with high titers of AFA (n=26) was

significantly greater than in the other SSc patients (n=73) or in any control group (P<0.001, by Kruskal-Wallis non parametric analysis of variance).

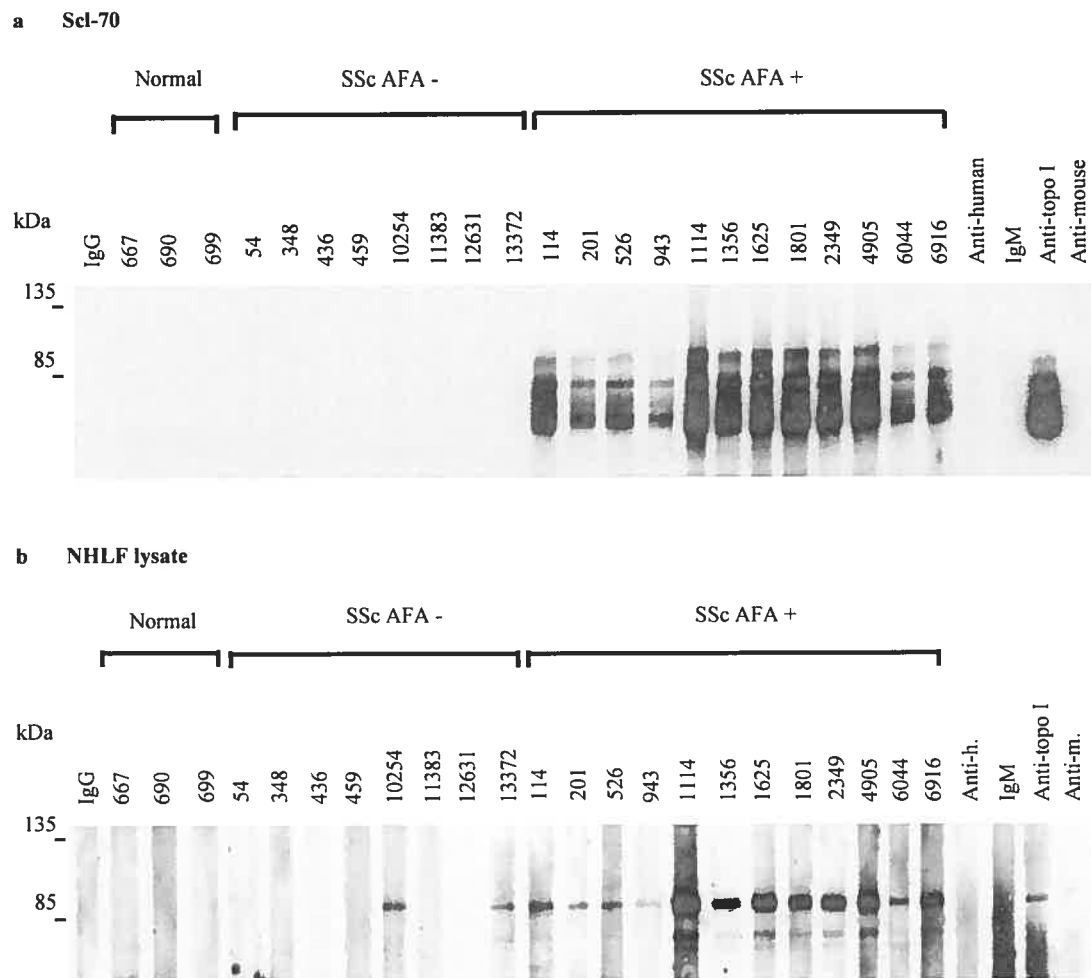


Figure 3. Reactivity against topo I in purified form or present in cell lysates according to AFA status. IgG preparations from AFA- and AFA+ SSc sera, and from normal sera were exposed to immunoblots displaying (a) affinity-purified topo I or (b) normal human lung fibroblasts (NHLF) lysates. Representative samples from each group are shown. Results are also shown for anti-human and anti-mouse second antibodies alone, and commercial human IgG (IgG) and mouse IgM (IgM), as negative controls. A mouse IgM monoclonal antibody against topo I (anti-topo I) was used as a positive control. All (n=25, 100%) IgG preparations from AFA+ sera recognized both purified topo I and topo I (95-100 kDa) from NHLF lysate.

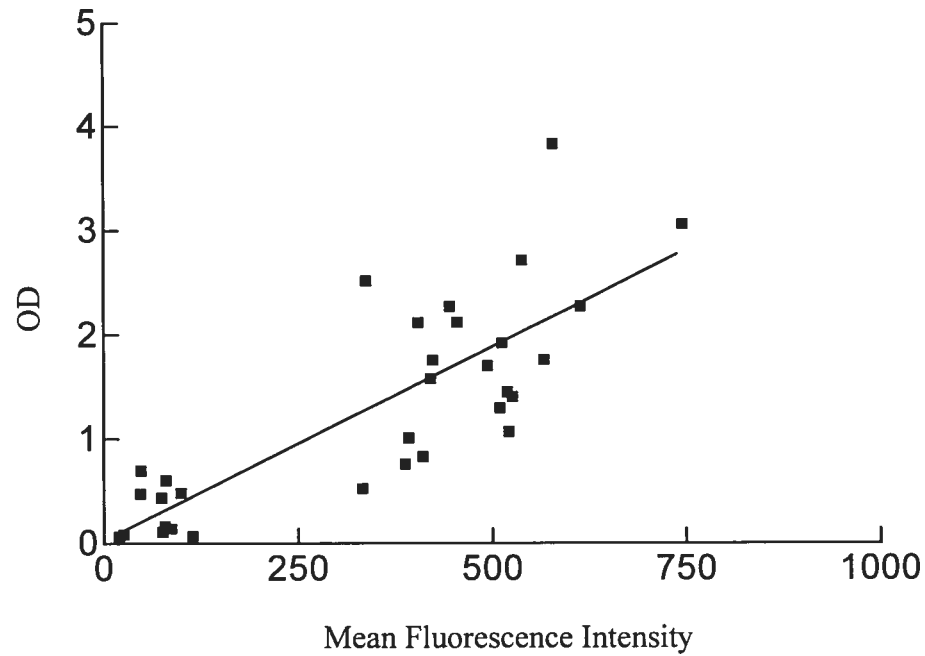


Figure 4. Strong correlation between AFA binding intensity and anti-topo I reactivity in SSc sera. Flow cytometry data of 32 randomly chosen SSc sera derived from the SSc cohort shown in Fig. 2 are expressed as MFI. Data for reactivity against topo I of the same 32 SSc sera are derived from the anti-topo I ELISA, and are expressed as OD. The correlation was highly significant ($r=0.65$, $P<0.0001$).

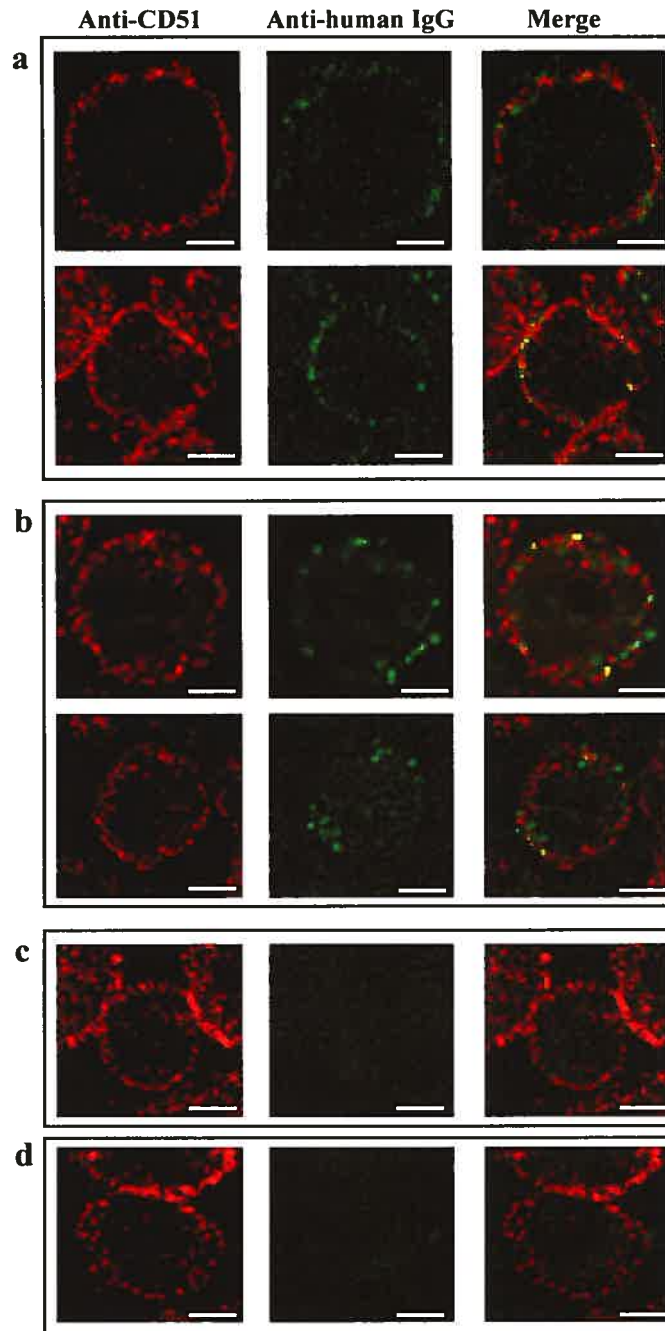


Figure 5. Cell surface localization of AFA binding sites by double indirect immunofluorescence and confocal laser microscopy. Unfixed WI-38 lung fibroblasts were incubated with (a) total IgGs purified from AFA+ SSc serum, (b) affinity-purified anti-topo I IgGs from an AFA+ SSc serum, (c) total IgGs purified from

AFA- SSc serum, and (d) total IgGs purified from normal human serum. Human IgG binding was revealed with a fluoresceinated second antibody to human IgG γ -chain (green). A mouse anti-CD51 antibody and a Cy3-conjugated anti-mouse second antibody were used as cell surface marker (red). In figure 5a and b, two examples of typical results are presented. The images shown are a representative example of 8 sera tested (AFA+ SSc sera, n=3; AFA- SSc sera, n=3; normal sera, n=2). The staining pattern of both total IgGs and affinity-purified anti-topo I IgGs from SSc AFA+ sera was dotted and clearly localized at the cell surface. No staining was detected on cells incubated with AFA- SSc sera and normal human sera. Bar = 10 μ m.

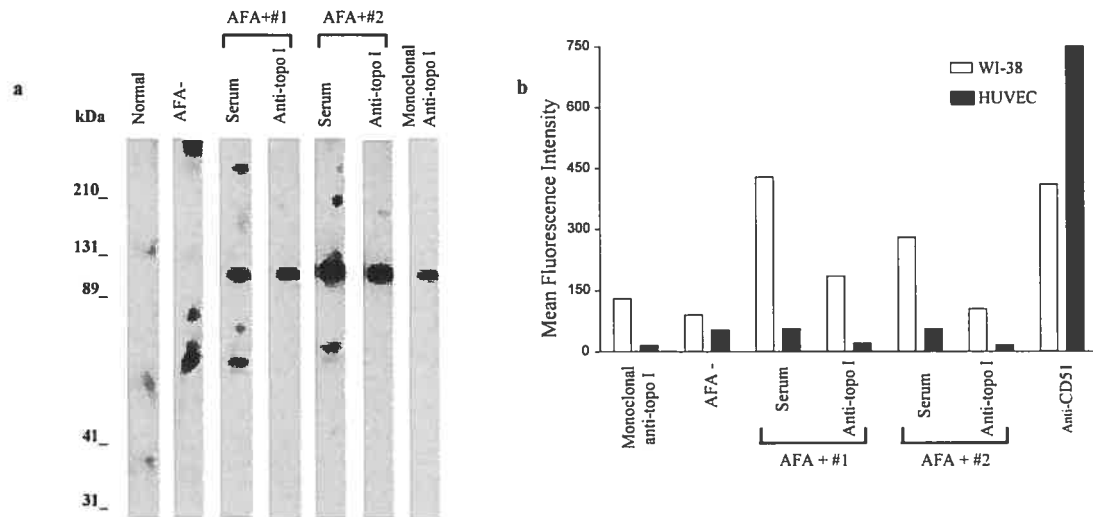


Figure 6. Anti-fibroblast binding activity of affinity-purified anti-topo I IgGs from AFA+ SSc sera. **(a)** Immunoblot on NHLF lysates using representative affinity-purified anti-topo I IgGs from two AFA+ sera. Only topo I was detected (95 kDa) by affinity-purified anti-topo I IgGs. A monoclonal mouse anti-human topo I was used as positive control and AFA- and normal sera were used as negative controls. This experiment was repeated three times with similar results. **(b)** Flow cytometry analysis of anti-fibroblast binding activity displayed by affinity-purified anti-topo I IgGs on WI-38 fibroblasts and HUVEC. Data are presented as MFI. Affinity-purified anti-topo I IgGs from both AFA+ sera were positive for fibroblast surface binding. Monoclonal mouse anti-human topo I and anti-CD51 antibodies were used as positive controls, and mouse IgM (IgM) as an isotypic control. Data presented are representative of two experiments repeated with similar results.

Article #2: La liaison de la topoisomérase I à la surface des fibroblastes induit l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires en présence d'auto-anticorps anti-topo I provenant de patients atteints de sclérose systémique.

Article publié dans Arthritis & Rheumatism : 54, 963-73, 2006

Présentation de l'article #2:

Cet article est une suite directe de l'**Article 1** et poursuit la caractérisation de la liaison des anti-topo I de patients sclérodermiques à la surface de fibroblastes. Le but de cet article était d'abord d'identifier la cible des anti-topo I à la surface des fibroblastes et ensuite de déterminer les effets de la liaison des anti-topo I.

Les résultats dignes de mention rapportés dans cet article sont que :

1. La topo I, libérée par des cellules endothéliales endommagées ou en apoptose, se lie à la surface des fibroblastes de façon spécifique et est reconnue par les anti-topo I de patients sclérodermiques.
2. La formation de complexes topo I/anti-topo I à la surface des fibroblastes est nécessaire et suffisante pour induire l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires.

Les résultats présentés dans cet article montrent pour la première fois que les anti-topo I de patients sclérodermiques ont le potentiel de participer à la pathogénèse de la maladie par l'entremise du recrutement et de l'activation de cellules immunitaires.

Contribution des auteurs à l'article 2:

J.H. : élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.

G.R. : collecte de résultats expérimentaux complémentaires à l'étude.

Y.R. : élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.

J.-L. S. : élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique et statistique des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.

Article #2: « DNA Topoisomerase I Binding to Fibroblasts Induces Monocyte Adhesion and Activation in the Presence of Anti-Topoisomerase I Autoantibodies from Systemic Sclerosis Patients »

Authors: Jill Hénault, Geneviève Robitaille, Jean-Luc Senécal and Yves Raymond

Jill Hénault, MSc, PhD candidate, Geneviève Robitaille, MSc, PhD candidate, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine.

Laboratory for Research in Autoimmunity, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Supported by grant MOP-68966 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research, and by studentships from Sclérodermie-Québec (JH, GR) and Fonds de la recherche en santé du Québec (JH).

Running head : DNA Topoisomerase I binding to fibroblasts.

Address correspondence and reprint requests to:

Yves Raymond, PhD
Laboratory for Research in Autoimmunity
Notre-Dame Hospital, CHUM
1560 Sherbrooke East
Montreal QC, H2L 4M1
Canada
Phone: 514-890-8000 ext. 25481

Fax : 514-412-7661

E-mail : [REDACTED]

ABSTRACT

Objective. Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by fibrosis due to excessive and deregulated collagen production by fibroblasts. Previously, we reported that anti-DNA topoisomerase I antibodies (anti-topo I) bound specifically to fibroblast surfaces, without however having identified their antigenic target. In this study, we characterized the target of anti-topo I on fibroblasts and the effects of their binding. **Methods.** Purified DNA topoisomerase I (topo I), or topo I released from apoptotic cells, were tested for surface binding to a number of human cell types by cell-based ELISA, flow cytometry and indirect immunofluorescence. Antibodies purified from SSc patient and normal control sera were used to detect topo I binding. The consequences of topo I and anti-topo I binding to fibroblasts were assessed by co-culture with THP-1 monocytes. **Results.** The autoantigen topo I itself was found to bind specifically to fibroblasts in a dose-dependent and saturable manner where it was recognized by anti-topo I from SSc patients. The binding of anti-topo I subsequently stimulated adhesion and activation of co-cultured monocytes. Topo I released from apoptotic endothelial cells was also found to bind specifically to fibroblasts. **Conclusion.** This report thus confirms and extends our previous study by showing that topo I binding to fibroblast surfaces is both necessary and sufficient for anti-topo I binding. Secondly, topo I/anti-topo I complex binding can then trigger the adhesion and activation of monocytes, thus providing a plausible

model for the amplification of the fibrogenic cascade in anti-topo I positive SSc patients.

Systemic sclerosis (SSc), or scleroderma, is an autoimmune disease characterized by excessive extracellular matrix (ECM) deposition, fibrosis and vascular obliteration in connective tissues of the skin, lungs, gastrointestinal tract, heart, and kidneys (1). Following a still undefined initial event, mononuclear cells such as lymphocytes and monocytes are recruited into connective tissues, where the subsequent release of inflammatory cytokines leads to fibroblast activation, collagen accumulation and tissue hypoxia (2).

One of the hallmarks of SSc is the presence, in over 90% of patient sera, of highly specific autoantibodies against a variety of nuclear proteins, i.e. antinuclear autoantibodies or ANAs (3). The most common ANAs associated with SSc include anti-DNA topoisomerase I (anti-topo I), anti-centromeric protein B (anti-CENP-B), anti-RNA polymerase III, and anti-Th/To autoantibodies. ANAs have been associated with different clinical manifestations and various degrees of SSc severity. For example, anti-topo I are usually associated with more diffuse cutaneous SSc (4, 5), whereas anti-CENP-B are detected predominantly in patients with limited cutaneous SSc (4, 6, 7). Also, anti-topo I are strongly associated with pulmonary fibrosis in SSc (6, 8), while pulmonary arterial hypertension is more common in patients with anti-CENP-B (9). In spite of the prevalence of ANAs and their association with different SSc subsets and selective visceral involvement, their direct or indirect role in the pathophysiology of SSc is still unclear.

Recent *in vitro* studies have demonstrated that some SSc autoantibodies directed against cell surfaces could display direct pathogenic effects. For example, anti-endothelial cell antibodies (AECA), present in 25% to 85% of SSc patients (10), have been shown to trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity in the presence of leukocytes (11, 12), while anti-fibroblast antibodies (AFA), present in 26% to 58% of SSc patients (13, 14), have been shown to induce a proadhesive and proinflammatory phenotype in fibroblasts upon binding (13, 15). Endothelial cell apoptosis and dysregulated fibroblast activation are cornerstones of SSc pathophysiology, the former being one of the earliest events observed during the disease (16), and the latter being directly responsible for the increased and continuous deposition of ECM, notably collagen I, in tissues (17-19). Although there is now evidence that AECAs and AFAs are directly implicated in the pathophysiology of SSc, no such evidence yet exists for ANAs.

In a previous study, we demonstrated that anti-topo I from SSc patients could bind specifically to the cell surface of fibroblasts via an unknown surface target (14). The aims of this study were therefore to (1) identify the fibroblast surface target of anti-topo I and (2) characterize the consequences of anti-topo I binding to fibroblasts on mobilization and activation of monocytes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and cell lines. Thirty-six SSc patients (12 anti-topo I negative, 24 anti-topo I positive) were selected randomly from a French Canadian cohort of 309 SSc

patients diagnosed between April 1984 and September 1999 at the Connective Tissue Diseases and Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, in Montreal (20, 21). All patients fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria for SSc. Sera were obtained at the time of SSc diagnosis, i.e. prior to treatment, coded and stored at -80°C. Control sera were collected as previously described from French Canadian gender and age-matched volunteers (22). Primary human dermis fibroblasts were isolated from biopsies obtained from lesional or non-lesional skin of patients with SSc or from gender and age-matched normal adult skin as previously described (23). Fibroblasts were cultured in DMEM supplemented with 10% inactivated FBS and 100 µg/ml of gentamicin sulfate (Wisent, Saint-Bruno, Quebec, Canada). Primary fibroblasts were used between passages 3-7. The following primary cell populations and their respective media were from Cambrex (Walkerville, MD): normal human lung fibroblasts (NHLF), normal human dermal fibroblasts from adult (NHDF-Ad) and neonate (NHDF-Neo) were cultured in FBM with 2% FBS, 5 µg/ml of bovine insulin, 1 ng/ml of human fibroblast growth factor-B (hFGF-B), gentamicin and sulfate amphotericin-B; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human microvascular endothelial cells from dermis (HMVEC-D) and lung (HMVEC-L) were grown in endothelial basal medium with EGM-2MV (5% FBS, 0.1% insulin-like growth factor-1, 0.1% ascorbic acid, 0.4% hFGF-B, 0.1% human epidermal growth factor (hEGF), 0.04% hydrocortisone, 0.1% human vascular endothelial growth factor, 0.1% gentamicin); human pulmonary artery smooth muscle cells from adult (PASMC-Ad) and neonate (PASMC-Neo) were grown in smooth muscle basal

medium to which was added the SmGM-2 bullet kit (5% FBS, 0.1% hEGF, 0.1% insulin, 0.2% hFGF-B and 0.1% gentamicin). All primary cells were used between passages 3-5. Subculturing was achieved before confluency using trypsin-EDTA and trypsin neutralizing solution (Cambrex).

THP-1 monocytes (ATCC, Manassas, VA) were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% inactivated FBS and 100 µg/ml of gentamicin sulfate (Wisent). Cells were grown at 37°C in air with 5% CO₂.

Endothelial cell apoptosis. HUVEC and HMVEC-D apoptosis was induced by growth factor deprivation as previously described (24, 25). Briefly, cells were grown in serum-free medium for 48-72 hr. Apoptosis was confirmed by immunofluorescence with Hoescht/PI (24, 25) and flow cytometry analysis of phosphatidylserine exposure on cell surfaces using fluoresceinated annexin V (BD Bioscience, Bedford, MA). Supernatants from several apoptotic HUVEC or HMVEC-D cultures were pooled. Dead cells and large apoptotic bodies were sedimented (20 000 x g, 4°C, 15 min) and pooled supernatants were concentrated 20 times using protein concentrators with a 5 kDa molecular weight cut-off (VivaScience). Supernatant proteins were quantitated using the Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA), following the manufacturer's instructions.

Topoisomerase I. Purified topo I from calf and/or rabbit thymus was obtained from Immunovision (Springdale, AR) and tested for purity upon arrival by gel electrophoresis and immunoblotting. Topo I major molecular species had a molecular weight of 70 kDa, with minor species at 80 kDa and 100 kDa.

Antibody purification. Human IgGs were purified from sera by affinity chromatography using NAb Protein G Spin Chromatography Kit (Pierce, Rockford, IL), following the manufacturer's instructions. Final IgG concentration was determined by Bradford dye-binding procedure (Bio-Rad, Hercules, CA) and varied from 2.0 to 11.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (14). Human anti-topo I were purified from SSc sera by affinity chromatography on immobilized topo I using Vivapure Epoxy Protein Coupling Kit (VivaScience, Hannover, Germany), following manufacturer's instructions, and then transferred into PBS (14). Final anti-topo I IgG concentrations were determined using Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce) and varied from 2.1 to 8.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Flow cytometry. Flow cytometry analyses were performed as previously described (14). Briefly, adherent cells were detached with PBS/0.5% EDTA and washed with PBS. Cells were first incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat IgG (Sigma, Oakville, On) in PBS-3% BSA to block non-specific binding sites. Cells were then incubated with topo I (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS-3% BSA for 30 min, washed with PBS, and incubated with IgG (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti-topo I (400 ng/ml) purified from SSc or normal control sera in PBS-3% BSA for 30 min. IgG binding was revealed with phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted 1:100. Cell permeability was assessed by addition of 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma) and permeable cells were gated out. Fluorescence was detected on a FACScan and analyzed by Cellquest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Cell-based ELISA. Cells were grown in collagen-coated 96 well culture microplates (Corning, Acton, MA) until confluence, washed with PBS and incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ goat IgG in complete medium. Cells were then incubated with topo I in complete medium, 30 min, washed with PBS and incubated 1 hr with a mouse anti-topo I monoclonal antibody (Sigma) diluted 1 in 100, IgG (50 $\mu\text{g/mL}$) from SSc or normal sera, or anti-topo I (400 ng/ml) purified from SSc sera in complete medium. Antibody binding was revealed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human or anti-mouse IgGs (Jackson) and o-phenylenediamine/citrate solution. Reaction was stopped by 2 M H_2SO_4 and the optical density (OD) at 490 nm was read in a MRX revelation microplate-reader (Dynex, Chantilly, VA).

Indirect immunofluorescence and confocal microscopy. Indirect immunofluorescence was performed as previously described (14). Briefly, cells were grown to 70-80% confluence on glass coverslips (Fisher Canada, Ottawa, On), washed with PBS and incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ goat IgG (Sigma) in complete medium. Cells were incubated with topo I (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 30 min or with supernatant from apoptotic endothelial cells 1 hr, washed with PBS, and incubated 1 hr with a mouse monoclonal anti-topo I antibody (Sigma) diluted 1 in 50, IgG (50 $\mu\text{g/mL}$) from SSc or normal sera, or anti-topo I (400 ng/ml) purified from SSc sera in complete medium. Cells were then washed with PBS and fixed with methanol (5 min, -20°C). IgG binding was detected with fluoresceinated (FITC)-goat anti-human or anti-mouse IgG (Jackson). Hoescht 33342 was used to stain nuclei. Cells were examined with a Nikon eclipse E600 fluorescence microscope using MetaMorph 4.6r9 software

(Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) or a Zeiss 510 confocal laser microscope (Zeiss, Thornwood, NY), as previously described (14).

Electrophoresis and immunoblotting. Proteins were diluted in electrophoresis sample buffer (25 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.25% bromophenol blue). Proteins were separated on 8% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were pre-incubated in blocking buffer (TBS/0.5% Tween-20/5% powdered skim milk) and incubated with a mouse IgM monoclonal anti-topo I (BD Bioscience) diluted 1 in 100 or with IgG (50 μ g/ml) from SSc sera. IgM and IgG binding was detected using a HRP-coupled goat anti-mouse IgM (Jackson) and a HRP-coupled goat anti-human IgG (Jackson), respectively and the Super Signal West Pico chemiluminescence kit (Pierce).

THP-1 adhesion assay. Fibroblasts (NHDF-Ad or NHLF) were grown in 96 well culture microplates (Corning) until confluence, incubated with topo I (0.5 μ g/ml) in complete medium, 30 min, washed with PBS, and incubated 1 hr with IgG (50 μ g/ml) or anti-topo I (400 ng/ml) purified from SSc or normal sera in complete medium. Fibroblasts were then washed with PBS. THP-1 monocytes, pre-incubated with BrdU (1% v/v) for 3 hr, were added to fibroblasts at a concentration of 2.5×10^5 cells/well in complete RPMI medium. THP-1 and fibroblasts were co-cultured for 30 min before removal of non-adhered THP-1 by thorough washing with PBS. THP-1 adhesion was assessed by anti-BrdU ELISA (Roche, Laval, Qc) following manufacturer's instructions. Reaction was stopped by 2 M H_2SO_4 and the optical density (OD) at 450 nm was read in a MRX revelation microplate-reader (Dynex).

THP-1 activation assay. Fibroblasts (NHDF-Ad or NHLF) were grown in 6 well culture microplates (Corning) until confluence, incubated with topo I (0.5 µg/ml) in complete medium, 30 min, washed with PBS, and incubated with IgG (50 µg/ml) or anti-topo I (400 ng/ml) purified from SSc or normal sera in complete medium, 1 hr. Fibroblasts were then washed with PBS and THP-1 monocytes were added at a dilution of 5.0×10^5 cells/well in complete RPMI medium. After 3 days of co-culture, THP-1 were detached with 0.02% EDTA in cold PBS and CD14 and CD11b expression was analysed by flow cytometry using anti-CD14-FITC and anti-CD11b-PE antibodies (Jackson). Permeable cells were gated out and fluorescence detected as previously described (14).

Preliminary characterization of topo I ligand. Fibroblasts (NHLF) were detached with PBS/0.5% EDTA or trypsin-EDTA (Cambrex) and washed with PBS. Trypsin-EDTA treated cells were allowed to recover in complete medium for 0, 10, 20 or 30 min at 37°C on a low-adherence plastic substrate. Brefeldin A effects on topo I binding was assessed by pre-treating fibroblasts with brefeldin A (Sigma) for 2 hr prior to trypsin-EDTA detachment. Fibroblasts were then allowed to recuperate in complete medium for 20 min as above. Topo I (0.5 µg/ml) binding to these fibroblasts was then analysed by flow cytometry as described above.

Statistical analysis. A Kruskal-Wallis non-parametric test followed by a Dunn's multiple comparison test were used for group comparisons after assays for topo I binding to different cell lines and THP-1 adhesion. A Mann Whitney non-parametric test was used for group comparisons after the THP-1 activation assay.

Statistical tests were performed with GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Topo I binds to the fibroblast surface and recruits anti-topo I.

In a previous study, we found that anti-topo I from SSc patients bound specifically to the cell surface of fibroblasts (14). Anti-topo I binding had been assayed by flow cytometry and indirect immunofluorescence on cells detached from the substratum, i.e. a procedure that inevitably damages some cells and provokes leakage of their contents into the medium. When we assessed anti-topo I binding to adherent fibroblasts, i.e. on cells that had not been detached from the substratum, we did not detect any binding (Fig. 1A), thus indicating that the antigenic target of anti-topo I was missing under these conditions. Hence, we hypothesized that endogenous topo I released from damaged cells had directly bound to fibroblasts and became the target of anti-topo I. As a direct test for this hypothesis, the presence of topo I in the supernatant of EDTA-detached cells was assessed by immunoblotting. Topo I was found to be present in the supernatant of EDTA-detached cells (Fig. 1B). Moreover, flow cytometry analysis showed that the addition of exogenous topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$) to EDTA-detached normal human dermal fibroblasts from adult (NHDF-Ad) increased significantly anti-topo I binding, i.e. over and above the binding of topo I released

from damaged cells (Fig. 1C). Anti-topo I did not bind to human microvascular endothelial cell from dermis (HMVEC-D), whether or not exogenous topo I was present (Fig. 1C). Topo I binding to cells was detected with IgG purified from all SSc anti-topo I + sera tested ($n = 24$) as well as with a mouse anti-topo I monoclonal antibody. None of the IgG from SSc anti-topo I – sera ($n = 12$) or normal sera ($n = 4$) bound to NHDF-Ad or normal human lung fibroblasts (NHLF), whether topo I was added or not (data not shown).

Exogenous topo I was also found to bind to live, adherent, unfixed and unpermeabilized fibroblasts. Exogenous topo I ($0.5 \mu\text{g/ml}$) was added to live cells, which was followed by the addition of IgG or anti-topo I purified from an anti-topo I positive SSc (SSc anti-topo I +) serum. Topo I binding was detected on NHDF-Ad surfaces but not HMVEC-D (Fig. 1A). Similar results were obtained when NHLF and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were assayed under the same conditions (data not shown). Since fluorescence patterns and intensities on NHDF-Ad were the same with both IgG and anti-topo I purified from an SSc anti-topo I + serum, we concluded that anti-topo I binding was due to the initial binding of topo I to the fibroblast surface.

These results clearly indicate that topo I bound to the fibroblast surface was the target detected by anti-topo I in our previous work (14).

Topo I binding on fibroblasts is dose-dependent and saturable.

To characterize topo I binding to fibroblasts, we performed cell-based ELISA experiments where increasing topo I concentrations, up to $5 \mu\text{g/ml}$, were added to adherent and intact NHDF-Ad and HMVEC-D (Fig. 2). We found that topo I binding

to cell surfaces was dose-dependent and saturable. Topo I binding was significantly higher on NHDF-Ad than on HMVEC-D at all concentrations tested ($p \leq 0.05$). Similar results were obtained when topo I binding to NHLF was compared to HUVEC (data not shown). Taken together, these results suggest that topo I bound to cells via a specific surface determinant whose expression and/or topo I affinity is increased on fibroblasts compared to endothelial cells.

Topo I binds specifically to fibroblasts.

To further assess the cellular specificity of topo I binding, we performed cell-based ELISA experiments where topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to adherent and intact fibroblasts (NHLF, NHDF-Ad and NHDF-Neo), endothelial cells (HUVEC, HMVEC-D and HMVEC-L) or smooth muscle cells (PASMC-Ad and PASMC-Neo; Fig. 3A). Topo I binding was detected with anti-topo I purified from SSc sera and an HRP-coupled anti-human IgG. For convenience, NHLF were used as an inter-plate control and the ratio of the binding intensity on each cell line over that on NHLF was determined. We found that all fibroblast cell lines tested bound topo I with an intensity similar to that of NHLF, while binding to smooth muscle cells and endothelial cells was significantly lower ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively). Similar differences were observed at topo I concentrations of 1.0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ (data not shown). These results confirm that fibroblasts displayed a higher affinity for topo I than other cell types.

Topo I binds to fibroblasts from SSc patients.

Compared to normal fibroblasts, SSc fibroblasts have primary metabolic abnormalities and altered responses to environmental signals (18). Therefore, there

could be differences between normal and SSc fibroblasts with respect to affinity for topo I. To address this issue, we quantitated topo I binding to primary fibroblasts from SSc patient ($n = 2$) and normal control ($n = 2$) biopsies (Fig. 3B). For each SSc patient, dermal fibroblasts derived from both lesional (L) and non-lesional (N-L) skin were tested. NHLF served as an inter-plate control, as described above. There was no significant difference between the relative topo I binding to normal and SSc fibroblasts (Fig. 3B). Once again, the origin of fibroblasts (L or N-L skin) did not influence topo I binding.

The possible differences between topo I binding pattern on the surface of normal *versus* SSc fibroblasts were assessed using indirect immunofluorescence (voir Annexe I, Fig. A1). No significant differences were noted.

Anti-topo I binding to fibroblasts stimulates adhesion and induces activation of THP-1 monocytes.

Monocytic cells are among the first cells to infiltrate the tissues during the onset of SSc (26). The capacity of topo I to recruit SSc anti-topo I to fibroblast cell surfaces prompted us to examine whether this was sufficient to induce subsequent monocyte adhesion. THP-1 monocytes were co-cultured with fibroblasts that had been pre-incubated with topo I ($0.5 \mu\text{g/ml}$) and normal or SSc IgG ($50 \mu\text{g/ml}$). THP-1 adhesion to NHDF-Ad was significantly increased when cells had been pre-incubated with topo I and IgG or anti-topo I purified from SSc anti-topo I + sera ($p < 0.001$ vs Normal and SSc anti-topo I – ; Fig. 4A).

We next determined whether THP-1 adhesion was followed by monocyte activation. Indeed, two markers of monocyte activation, CD14 and CD11b, were significantly

up-regulated on THP-1 co-cultured with NHDF-Ad that had been pre-incubated with topo I and IgG ($p < 0.0004$ vs Normal; $p < 0.0001$ vs SSc anti-topo I -) or anti-topo I ($p < 0.0022$ vs Normal; $p < 0.0004$ vs SSc anti-topo I -) purified from SSc anti-topo I + sera (Fig. 4B and C). Similar results for monocyte adhesion and activation were observed when using NHLF (data not shown).

Taken together, these data indicate that the binding of topo I/anti-topo I complexes to fibroblast surfaces is sufficient for recruitment and subsequent activation of monocytes.

Topo I from apoptotic endothelial cells binds fibroblasts specifically.

Topo I expression is normally restricted to the nucleus. However, nuclear autoantigens are redistributed in apoptotic bodies during apoptosis (27, 28) and some even become available for autoantibody recognition (29). Since endothelial cell apoptosis is a hallmark of SSc (16), we examined whether topo I released from apoptotic HMVEC-D or HUVEC was also capable of specifically binding to fibroblasts. Endothelial cell apoptosis was induced by growth factor deprivation for 48-72 hr. Under these conditions, more than 90% of the cells are induced to apoptosis. Apoptosis was confirmed by immunofluorescence analysis with Hoescht/PI staining and flow cytometry analysis of phosphatidylserine exposure on the cell surface using fluoresceinated annexin V (voir Annexe I, Fig. A2). Topo I present in the concentrated culture supernatant of apoptotic endothelial cells displayed the typical molecular species (76 and 80 kDa) associated with caspase-cleaved topo I (30) (Fig. 5A). A lysate from non-apoptotic endothelial cells and purified topo I were used as controls, the former containing the intact form of topo I

(100 kDa) and the latter displaying the typical molecular products of topo I proteolysis (major, 70 kDa; minor, 80 kDa) (31). Topo I is very sensitive to proteolysis and its degradation during purification is common (31).

The culture supernatant from apoptotic HMVEC-D was added to live, unfixed and unpermeabilized NHDF-Ad and HMVEC-D for 1 hr and topo I binding was detected with IgG purified from SSc anti-topo + sera. Consistent with our previous findings (Fig. 1C), topo I from apoptotic endothelial cells bound to fibroblasts but not to endothelial cell surfaces (Fig. 5B). Similar results were obtained using NHLF and HUVEC (data not shown). To confirm that topo I was detected, and not other proteins present in the supernatant from apoptotic endothelial cells, the experiments were repeated with anti-topo I purified from SSc sera and a mouse anti-topo I monoclonal antibody. Similar results were obtained (data not shown), confirming that topo I was the polypeptide in the apoptotic supernatant that specifically bound to fibroblast surfaces. No staining was observed when IgG from normal and SSc anti-topo – sera were used (data not shown).

Preliminary characterization of topo I ligand on fibroblast surface.

One possible ligand for topo I on the fibroblast surface was surface-bound DNA. Indeed, cell surface DNA has been reported in previous studies (32, 33). However, prior incubation of intact cells with DNase did not affect topo I binding to the fibroblast surface (data not shown). On the other hand, prior trypsin-EDTA (0.125 mg/ml) treatment was found to completely inhibit topo I binding to the fibroblast surface (Fig. 6A), suggesting that the topo I ligand was a protein. Interestingly, when trypsin-EDTA treated cells were allowed to recuperate for 10, 20 or 30 min in

complete medium at 37°, gradual recovery of topo I binding to the cell surface was observed (Fig. 6A). The speed of this recovery suggested that the topo I ligand was readily available in the cytoplasm for transport to the cell surface. To test this hypothesis, we pre-treated fibroblasts with brefeldin A, a well-known inhibitor of protein transport to the cell surface (34). Brefeldin A-treated fibroblasts were then detached with trypsin-EDTA (0.125 mg/ml) and allowed to recuperate in complete medium for 20 min, as described above. Under these conditions, no topo I ligand re-expression at the fibroblast surface was observed (Fig. 6B).

Taken together, these preliminary data suggest that the topo I ligand is a surface protein, or protein complex, capable of rapid surface trafficking.

DISCUSSION

ANAs are well-established markers for SSc. They are present in up to 90% of SSc patient sera and are generally associated with specific SSc subtypes (35-37). However, their role in the pathogenesis of SSc is still unclear and few studies have directly addressed this subject (37). One of the reasons for this situation is that ANAs in SSc are traditionally considered as bystander products of an immune system that has gone awry. Sequestered in cell nuclei, ANA targets are presumed to be inaccessible to circulating SSc autoantibodies, therefore leading to the notion that ANAs cannot play an active part in the disease etiology. Our recent findings shed new light on the possible role of some ANAs in SSc pathogenesis. Indeed, we demonstrate for the first time that topo I binds to fibroblast surfaces, recruits SSc anti-topo I and subsequently induces monocyte adhesion and activation.

Topo I is a 100 kDa nuclear enzyme responsible for DNA relaxation during transcription and replication (38). During apoptosis, topo I is cleaved into major fragments of 70 to 80 kDa (30, 39) and is redistributed into blebs and apoptotic bodies (30). These apoptotic cell remnants should normally be rapidly cleared by phagocytes. However, in the event of a sudden increase in apoptotic cell numbers, the capacity of normal clearance mechanisms may be exceeded, resulting in the accumulation and progress of apoptotic cells towards a late apoptotic state, i.e. secondary necrosis, thereby allowing the release of apoptotic body contents to the medium. This may be the case in SSc, where endothelial cell apoptosis is detected simultaneously in several tissues, notably around small blood vessels (16, 40). As we have shown above, topo I can be released from apoptotic endothelial cells, probably due to the increased permeability of secondary necrotic bodies. Hence, this released topo I could bind to nearby cells in SSc tissues. Since topo I has a specific affinity for fibroblast surfaces, it could bind to bystander fibroblasts, recruit circulating anti-topo I, present only in SSc patients, which would then induce adhesion and activation of circulating monocytes. Ultimately, this chain of events could lead to (1) amplification of the immune responses due to pro-inflammatory cytokines released by activated monocytes, and (2) fibrosis due to local secretion of pro-fibrotic cytokines by activated fibroblasts. Thus, the presence of anti-topo I in SSc patients would be directly associated with increased immune responses and fibrosis.

The hypothesis that anti-topo I could directly contribute to the pathogenesis of fibrosis in SSc is supported by several indirect findings. First, anti-topo I are associated with a more severe SSc phenotype, notably pulmonary fibrosis (8, 41-44).

Second, in patients with anti-topo I, these antibodies are almost invariably present very early during the disease course (43). Third, anti-topo I titers correlate with disease severity (42). Moreover, anti-topo I titers are higher in patients with active disease compared to those with inactive disease (42). Some SSc patients even display anti-topo I titers that fluctuate in parallel with the total skin score (42). Strikingly, SSc patients who have lost anti-topo I experience significant improvements in pulmonary function and survival, in comparison with patients in whom anti-topo I persist (44). Although convincing, all of these findings remain indirect and an *in situ* localization of anti-topo I in SSc tissues will be important to further establish their pathogenic role.

Anti-topo I are not the only autoantibodies that bind to the cell surface via a nuclear autoantigen. For example, nucleosomes, or DNA-histone complexes, have been shown to recruit anti-double-stranded DNA autoantibodies to the surface of various cell types (45). In that particular case, a non-identified 94 kDa protein has been pinpointed as the target of nucleosomes on cell surfaces. It is therefore likely that topo I binds to cells via a surface protein, or protein complex, that remains to be identified. Interestingly, this ligand seems to be more abundant on fibroblasts, independently of their origin, than on other cell types. Experiments to identify the cell surface ligand of topo I on fibroblasts are currently in progress in our laboratory.

The pathogenesis of SSc, like all systemic autoimmune diseases, is extremely complex (2). The presence of specific autoantibodies is only one immune abnormality among several others in this disease. However, the association of specific ANAs with different SSc subsets and with different patterns of organ involvement suggests

that these autoantibodies are directly implicated in the disease pathogenesis. Anti-topo I could therefore drive the disease toward a more severe phenotype. A better understanding of the pathogenic role of ANAs in SSc could lead to new therapeutic strategies to improve the survival of patients.

ACNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mélanie Tremblay for performing the initial experiment showing topo I binding to fibroblasts, Isabelle Clément for expert technical assistance and Mr. Jacques Moisan for insightful suggestions on statistical considerations. We are grateful to Mr. Fernand Locas and Mrs. Gisèle Sarrazin-Locas, and to the Comité Fonds Sainte-Jeanne-d'Arc of the Dollard-Cormier Foundation for generous donations in support of our laboratory.

REFERENCES

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr. et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15(2):202-205.
2. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004; 140(1):37-50.
3. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 49(3):399-412.
4. Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, Picillo U, Vatti M. Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol* 1986; 13(5):911-916.
5. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(2):196-203.
6. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81(2):154-167.
7. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):378-385.
8. Diot E, Giraudeau B, Diot P, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL et al. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest* 1999; 116(3):715-720.
9. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1):203-209.
10. Renaudineau Y, Revelen R, Levy Y, Salojin K, Gilburg B, Shoenfeld Y et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(2):156-160.
11. Marks RM, Czerniecki M, Andrews BS, Penny R. The effects of scleroderma serum on human microvascular endothelial cells. Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Arthritis Rheum* 1988; 31(12):1524-1534.
12. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11):2550-2562.
13. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(6):1602-1613.
14. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(10):3265-3274.

15. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum* 2002; 46(6):1595-1601.
16. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98(3):785-792.
17. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974; 54(4):880-889.
18. Strehlow D, Korn JH. Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10(6):572-578.
19. Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B, Krieg T. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J Mol Med* 1998; 76(3-4):266-274.
20. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44(3):735-736.
21. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980; 23(5):581-590.
22. Senecal JL, Rauch J, Grodzicky T, Raynauld JP, Uthman I, Nava A et al. Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1347-1353.
23. Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F et al. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31(6):432-439.
24. Hebert MJ, Gullans SR, Mackenzie HS, Brady HR. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 1998; 152(2):523-532.
25. Raymond MA, Vigneault N, Luyckx V, Hebert MJ. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(2):261-269.
26. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995; 63(1):48-56.
27. Dieude M, Senecal JL, Rauch J, Hanly JG, Fortin P, Brassard N, Raymond Y. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(10):2695-707.
28. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994; 179(4):1317-30.

29. Miranda-Carus ME, Askanase AD, Clancy RM, Di DF, Chou TM, Libera MR et al. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF-alpha by macrophages. *J Immunol* 2000; 165(9):5345-5351.
30. Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW, Jr., Stewart L et al. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274(7):4335-4340.
31. Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979; 254(20):10514-10522.
32. Bennett RM, Davis J, Merritt M. Anti-DNA antibodies react with DNA expressed on the surface of monocytes and B lymphocytes. *J Rheumatol* 1986; 13(4):679-685.
33. Bennett RM, Cornell KA, Merritt MJ, Bakke AC, Hsu PH, Hefeneider SH. Autoimmunity to a 28-30 kD cell membrane DNA binding protein: occurrence in selected sera from patients with SLE and mixed connective tissue disease (MCTD). *Clin Exp Immunol* 1991; 86(3):374-379.
34. Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; 261(24):11398-11403.
35. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(6):778-784.
36. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(4):534-540.
37. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 2005; 32(9):1643-1649.
38. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:369-413.:369-413.
39. Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med* 1996; 184(2):765-770.
40. Nguyen VA, Sgonc R, Dietrich H, Wick G. Endothelial injury in internal organs of University of California at Davis line 200 (UCD 200) chickens, an animal model for systemic sclerosis (Scleroderma). *J Autoimmun* 2000; 14(2):143-149.
41. Hatakeyama A, Kasturi KN, Wolf I, Phelps RG, Bona CA. Correlation between the concentration of serum anti-topoisomerase I autoantibodies and histological and biochemical alterations in the skin of tight skin mice. *Cell Immunol* 1996; 167(1):135-140.
42. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(5):1363-1373.
43. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 1991; 34(1):68-77.

44. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(5):1074-1084.
45. Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J et al. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(12):4669-4673.

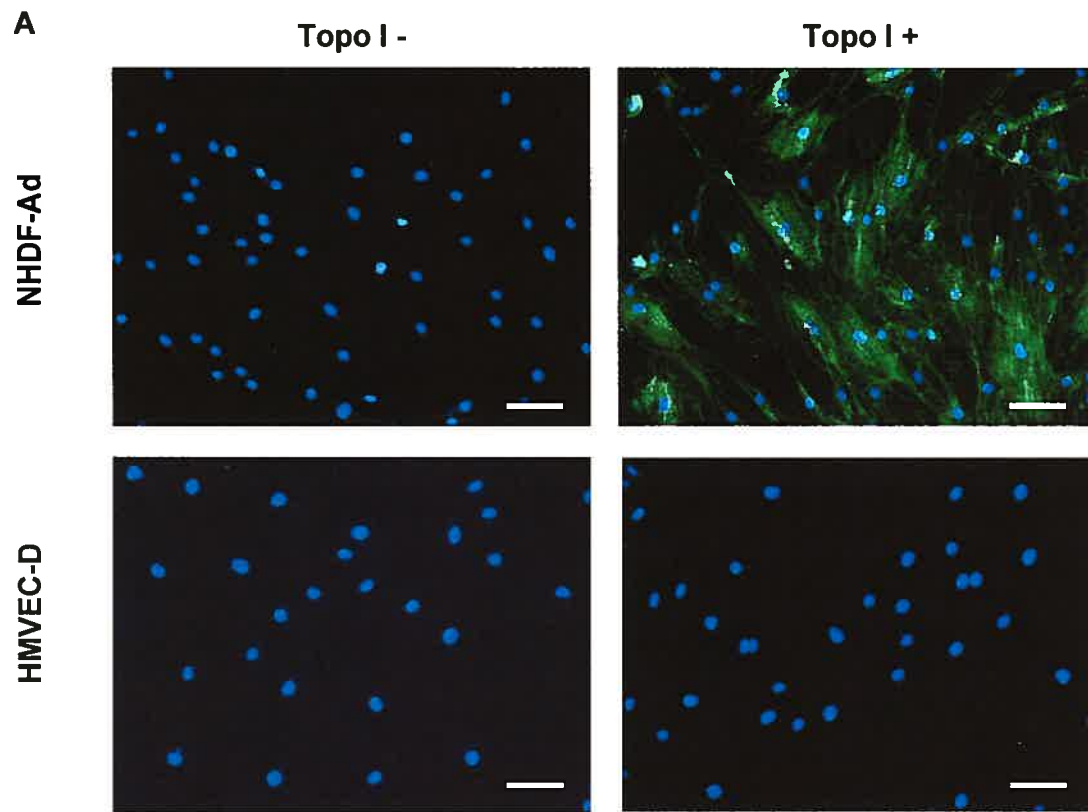


Figure 1 A. Detection of topo I binding by indirect immunofluorescence. NHDF-Ad and HMVEC-D were incubated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ topo I followed by IgG purified from anti-topo I positive SSc serum and a fluoresceinated second antibody to human IgG (green). Hoescht 33342 was used to detect nuclei (blue). Topo I binding was detected on fibroblast but not on endothelial surfaces. No antibody binding was observed in the absence of topo I. Bar = 25 μm .

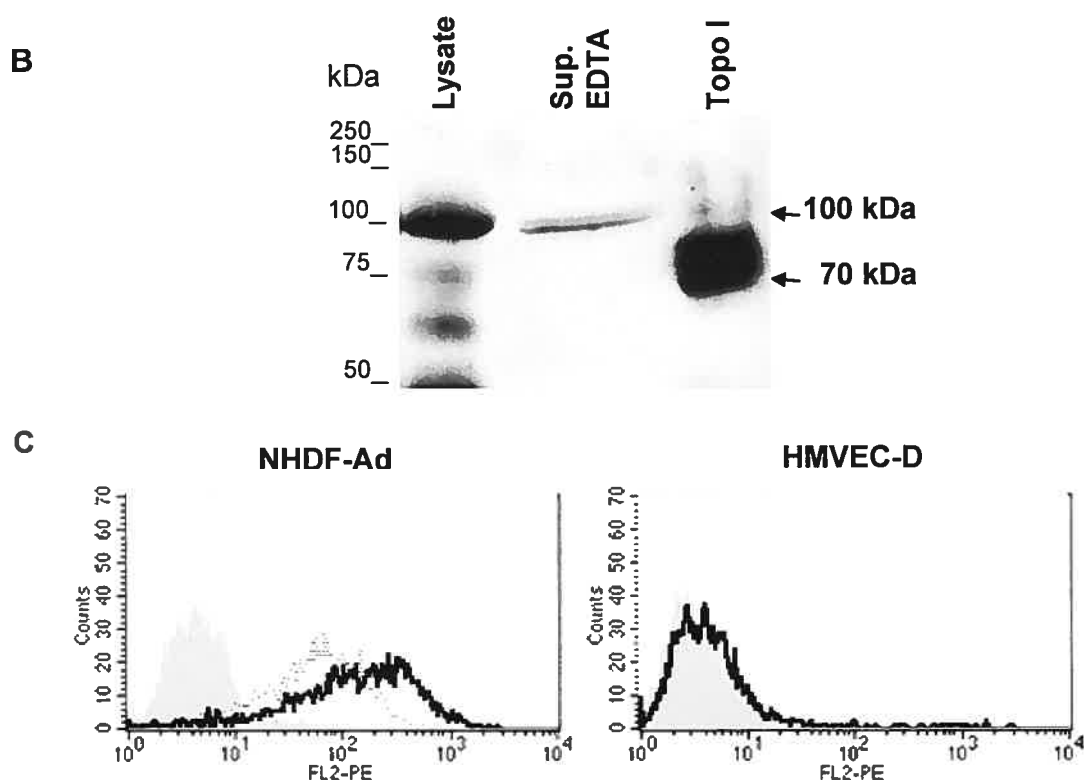


Figure 1 B and C. (B) Detection of topo I in supernatant of cells treated with PBS/0.5% EDTA (Sup EDTA). Human microvascular endothelial cells from dermis (HMVEC-D) were treated with PBS/0.5% EDTA and cells were spun down (400 x g, 5 min). Supernatants were recovered and topo I was detected by immunoblotting with purified IgG from anti-topo I positive SSc serum. Lysate from non-treated HMVEC-D (Lysate) and affinity-purified topo I (Topo I) were used as controls. Similar results were obtained for PBS/0.5% EDTA-treated NHDF-Ad (data not shown). (C) Flow cytometry analysis of topo I binding to NHDF-Ad and HMVEC-D. Topo I binding was detected using anti-topo I antibodies purified from anti-topo I positive SSc serum and a second (R-PE)-conjugated antibody to human IgG γ -chain. Data are presented as intact cell counts versus fluorescence intensity. Permeable cells

have been gated out after vital staining with 7-AAD, as described under Materials and Methods. Antibody binding to the surface of cells incubated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ topo I (thick filled line) or without topo I (thin dotted line) was measured. Cells incubated with secondary antibody alone (shaded area) were used as controls. Anti-topo I bound only to fibroblasts, not to endothelial cells, and the binding intensity was increased after incubation with exogenous topo I. Results are representative of three independent experiments.

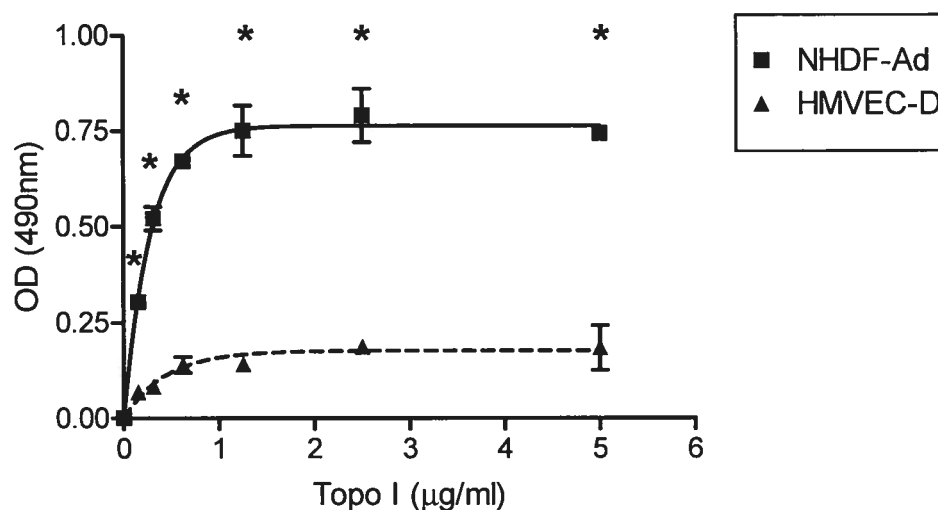


Figure 2. Dose-response curves of topo I binding to fibroblasts and endothelial cells by cell-based ELISA. Live normal adult human dermal fibroblasts (NHDF-Ad) (■) and human microvascular endothelial cells from dermis (HMVEC-D) (▲) were incubated with increasing concentrations of topo I. Topo I binding was detected with anti-topo I purified from SSc sera, and with a horseradish peroxidase-coupled second antibody to human IgG. Data are presented as mean \pm SEM optical density (OD_{490nm}) from pooled triplicate experiments. Topo I binding to NHDF-Ad was significantly higher than to HMVEC-D at all concentrations tested (*, $p \leq 0.05$).

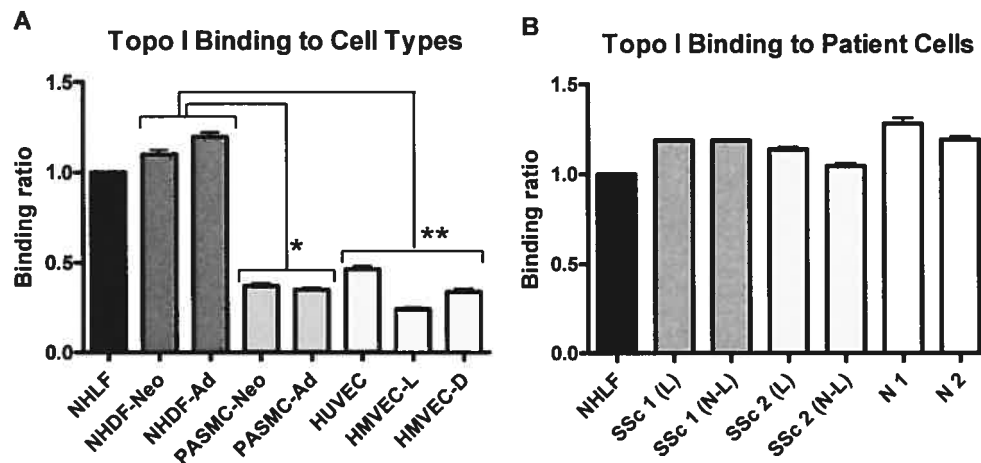


Figure 3. Cell-based ELISA analysis of topo I binding to different human cell types (A) and fibroblasts from SSc patients (B). Live cells were incubated with topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$) and binding was detected with anti-topo I purified from SSc sera, and with a horseradish peroxidase-coupled second antibody to human IgG. Data are presented as ratio of topo I binding to cell lines vs binding to NHLF \pm SD ($n = 4$). Topo I binding to fibroblast cell lines was significantly higher than to smooth muscle cell (*, $p \leq 0.01$) and endothelial cell (**, $p \leq 0.001$) lines. There was no significant difference between topo I binding to patient (SSc1, SSc2) and normal (N1, N2) fibroblasts. NHDF-Neo = normal human dermal fibroblasts from neonate, NHDF-Ad = normal human dermal fibroblasts from adult, PASMC-Neo = human pulmonary artery smooth muscle cells from neonate, PASMC-Ad = human pulmonary artery smooth muscle cells from adult, HUVEC = human umbilical vein endothelial cells, HMVEC-L = human microvascular endothelial cells from lung, HMVEC-D = human microvascular endothelial cells from dermis, L = Lesional skin, N-L = Non-lesional skin, N = Normal control.

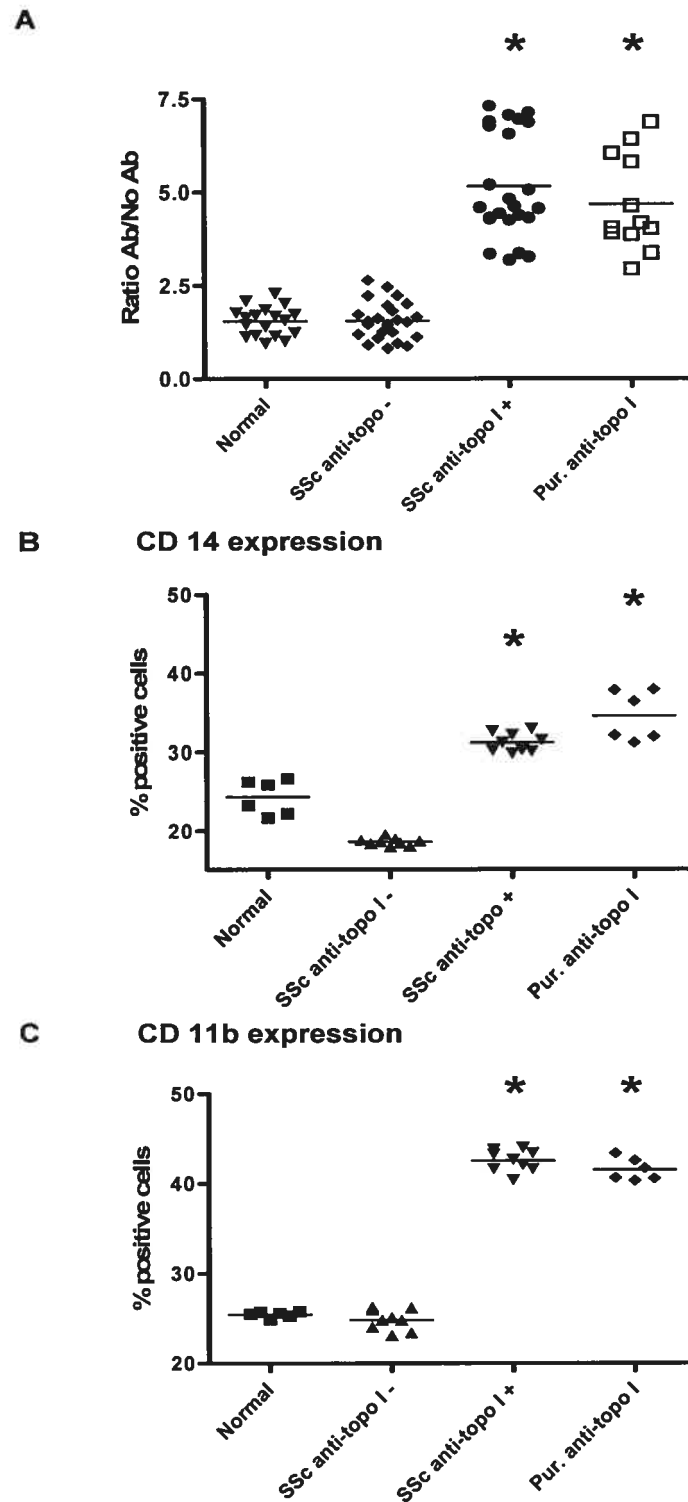


Figure 4. Analysis of monocyte adhesion to fibroblasts incubated with topo I and SSc patient antibodies. (A) Normal adult human dermal fibroblasts (NHDF-Ad) were

preincubated with topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$) followed by IgG from normal sera (\blacktriangledown) ($n = 3$), IgG from SSc anti-topo I negative (SSc anti-topo I $-$) sera (\blacklozenge) ($n = 4$), IgG from SSc anti-topo I positive (SSc anti-topo I $+$) sera (\bullet) ($n = 4$) or with anti-topo I purified from SSc sera (Pur. Anti-topo I) (\square) ($n = 2$). BrdU-labeled THP-1 cells were then allowed to adhere to the pretreated NHLF. THP-1 cell adhesion to NHDF-Ad incubated with topo I alone (No Ab) served as background value. Data are presented as ratios of BrdU intensity in the presence of antibodies compared to the No Ab control, from pooled triplicate experiments. THP-1 adhesion to NHDF-Ad was significantly increased in the presence of IgG from SSc anti-topo I $+$ sera (*, $p < 0.001$ vs Normal or SSc anti-topo I $-$) and of anti-topo I purified from SSc sera (*, $p < 0.001$ vs Normal or SSc anti-topo I $-$). **(B, C)** THP-1 monocyte activation in the presence of fibroblasts preincubated with topo I and SSc patient antibodies. THP-1 cells were co-cultured for three days with NHDF-Ad preincubated with topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$) and IgG from normal sera (\blacksquare) ($n = 2$), from SSc anti-topo I negative (anti-topo I $-$) sera (\blacktriangle) ($n = 3$), from SSc anti-topo I positive (SSc anti-topo I $+$) sera (\blacktriangledown) ($n = 3$) or with anti-topo I purified from SSc sera (Pur. Anti-topo I) (\blacklozenge) ($n = 2$). CD14 **(B)** and CD11b **(C)** expression levels on THP-1 cells were assessed by flow cytometry. Data are presented as percentage of positive cells from pooled triplicate experiments. CD14 and CD11b expression on THP-1 cells was significantly increased in presence of IgG from SSc anti-topo I $+$ sera (*, $p < 0.0004$ vs Normal or SSc anti-topo I $-$) and anti-topo I purified from SSc sera (*, $p < 0.002$ vs Normal or SSc anti-topo I $-$).

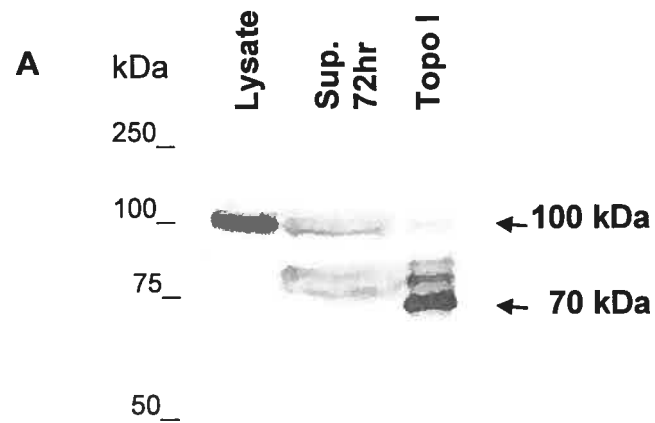


Figure 5 A. Topo I in supernatants from apoptotic HMVEC-D was detected by immunoblotting with purified IgG from anti-topo I positive SSc serum. Non-apoptotic HMVEC-D (Lysate) and affinity-purified topo I were used as controls.

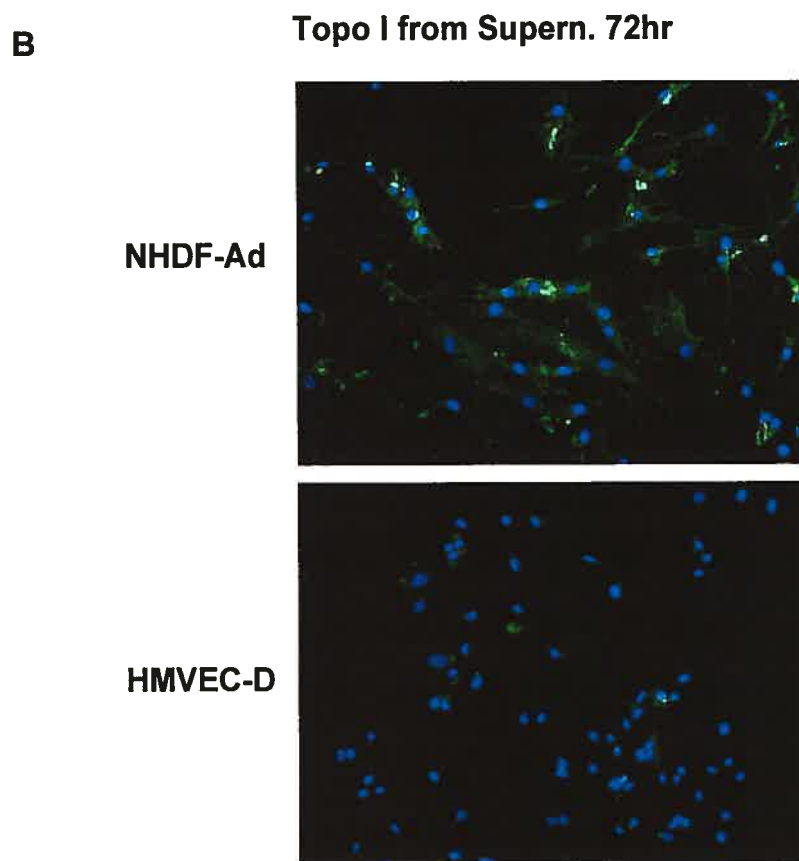


Figure 5 B. Topo I from apoptotic endothelial cells binds to fibroblasts. Apoptosis of HMVEC-D was induced by serum starvation for 72 hr. Binding of topo I from the supernatant of apoptotic HMVEC-D to NHDF-Ad or HMVEC-D was detected by indirect immunofluorescence using IgG purified from SSc anti-topo I positive serum and a fluoresceinated second antibody to human IgG (green). Hoescht 33342 was used to detect nuclei (blue). Staining was only observed on NHDF-Ad. Results are representative of three independent experiments.

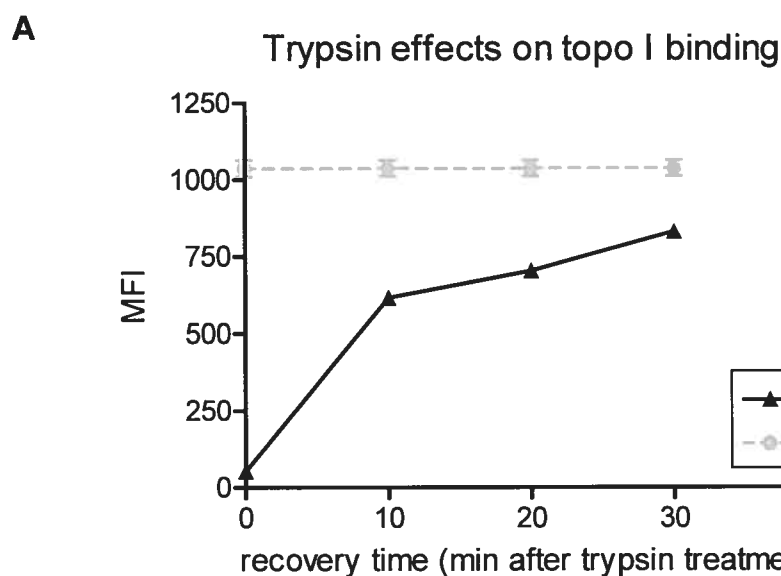


Figure 6 A. Effects of trypsin-EDTA treatment on topo I binding to the fibroblast surface. NHLF were detached using PBS-0.5% EDTA or trypsin-EDTA (0.125 mg/ml) and trypsin-EDTA detached cells were allowed to recuperate in complete medium for 0, 10, 20 or 30 min. Topo I (0.5 μ g/ml) binding to the cell surface was measured by flow cytometry using IgG from an anti-topo I + SSc patient (50 μ g/ml) and PE-conjugated anti-human IgG antibody. Data are presented as mean fluorescence intensity (MFI). Results are representative of at least two independent experiments.

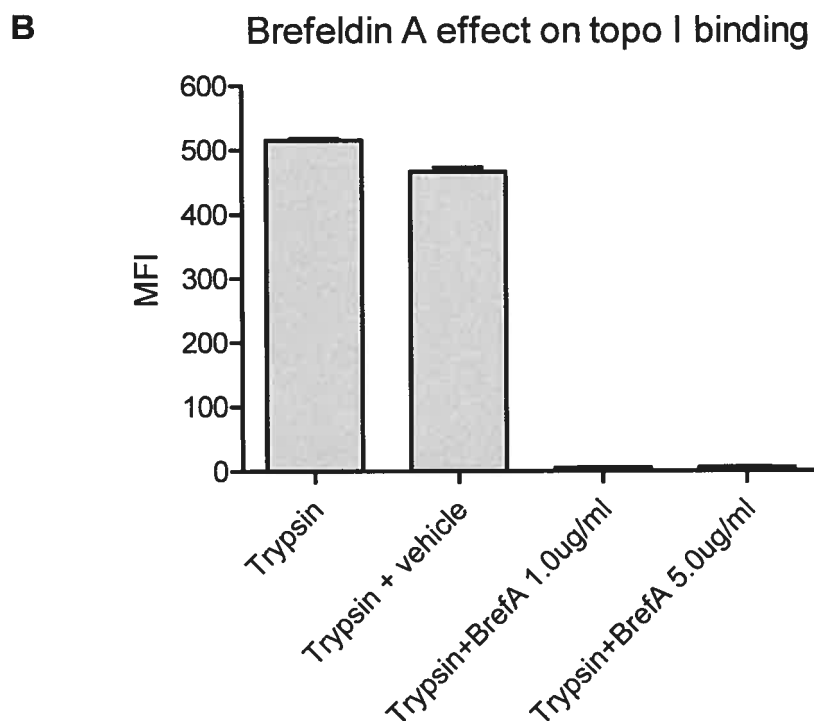


Figure 6 B. Effects brefeldin A treatment on topo I binding to the fibroblast surface. NHLF were pre-treated with 1.0 or 5.0 $\mu\text{g/ml}$ brefeldin A (BrefA) or vehicle only for 2 hr in complete medium before being detached using trypsin-EDTA (0.125mg/ml). Trypsin-EDTA detached cells were allowed to recuperate in complete medium for 20 min. Topo I binding was assessed and measured as above. Data are presented as mean fluorescence intensity (MFI). Results are representative of at least two independent experiments.

Discussion générale

La présence d'auto-anticorps chez les patients atteints de Scl est quasi universelle (3). Bien que leur valeur diagnostique et pronostique soit maintenant établie, leur rôle dans la pathogénèse de la maladie reste un sujet de controverse.

Cette étude avait donc pour but d'investiguer le potentiel pathogénique des auto-anticorps, et plus particulièrement des ANA, dans la Scl.

Rôle pathogénique des anti-topo I dans la Scl

La première partie de cette étude (Article #1) visait à examiner la prévalence des AFA chez les patients sclérodermiques ainsi que les possibles corrélations entre la présence de ces auto-anticorps et les ANA spécifiques à la Scl. Comme l'avait précédemment démontré Chizzolini et son équipe(5), les résultats obtenus dans notre étude ont montré la prépondérance des AFA chez les patients sclérodermiques. Nos résultats ont également démontré l'existence d'une forte corrélation entre la présence d'AFA et d'anti-topo I chez ces mêmes patients. Finalement, nous avons démontré que des anti-topo I, purifiés à partir de sera de patients sclérodermiques, pouvaient lier de manière spécifique la surface des fibroblastes (338). Ces observations majeures suggéraient, pour la première fois, un possible rôle des anti-topo I dans la pathogénèse de la Scl.

La seconde partie de cette étude (Article #2) s'adressait plus particulièrement aux effets de la liaison des anti-topo I de patients sclérodermiques à la surface des

fibroblastes ainsi qu'à l'identification du déterminant membranaire ciblé par ces auto-anticorps (238).

Nous avons démontré que la topo I elle-même était la cible des anti-topo I à la surface des fibroblastes. En effet, nous avons démontré que la topo I, relâchée par des cellules endothéliales perméabilisées ou en apoptose tardive, pouvait lier de façon spécifique la surface des fibroblastes et recruter des anti-topo I (Fig. 1 et 5, Article #2). Ce résultat est d'un grand intérêt puisque l'apoptose de cellules endothéliales est l'un des événements les plus précoces détectés chez les patients sclérodermiques ainsi que chez les modèles animaux de la maladie (205;339). Ce phénomène est étendu et se produit simultanément dans plusieurs organes (205;339), ce qui pourrait entraîner une saturation des mécanismes normaux d'élimination des cellules apoptotiques et, subséquemment, une dégénérescence de certaines cellules vers une apoptose tardive ou nécrose secondaire. La topo I est une protéine strictement intra-nucléaire normalement localisée sur la chromatine (118). Cependant, lors d'apoptose tardive, la topo I se dissocie de l'ADN présent dans les corps apoptotiques (annexe II, Fig. A3) et est relâchée dans le milieu (article #2, Fig. 1). Dans le contexte de la Scl, il est donc possible que la topo I, relâchée par des cellules endothéliales en apoptose, puisse se lier de façon locale aux fibroblastes du tissu conjonctif.

Cette situation pourrait avoir des conséquences aggravantes chez les patients sclérodermiques possédant déjà des anti-topo I en circulation. En effet, nous avons démontré que les complexes topo I/anti-topo I à la surface des fibroblastes peuvent induire l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (article #2, Fig. 4; annexe II, Fig.

A4). Or, dans la Scl, l'apoptose des cellules endothéliales résulte en une perméabilisation de l'endothélium vasculaire (37). Chez les patients possédant des anti-topo I, cette perméabilisation pourrait permettre aux auto-anticorps d'infiltrer le tissu conjonctif et de se lier à la topo I présente à la surface des fibroblastes. Les complexes topo I/anti-topo I seraient alors reconnus par les monocytes circulants, causant leur activation. Les cytokines produites par les monocytes ainsi activés contribuerait alors à l'intensification de la boucle pro-inflammatoire et pro-fibrotique caractéristique de la Scl (Fig. 6).

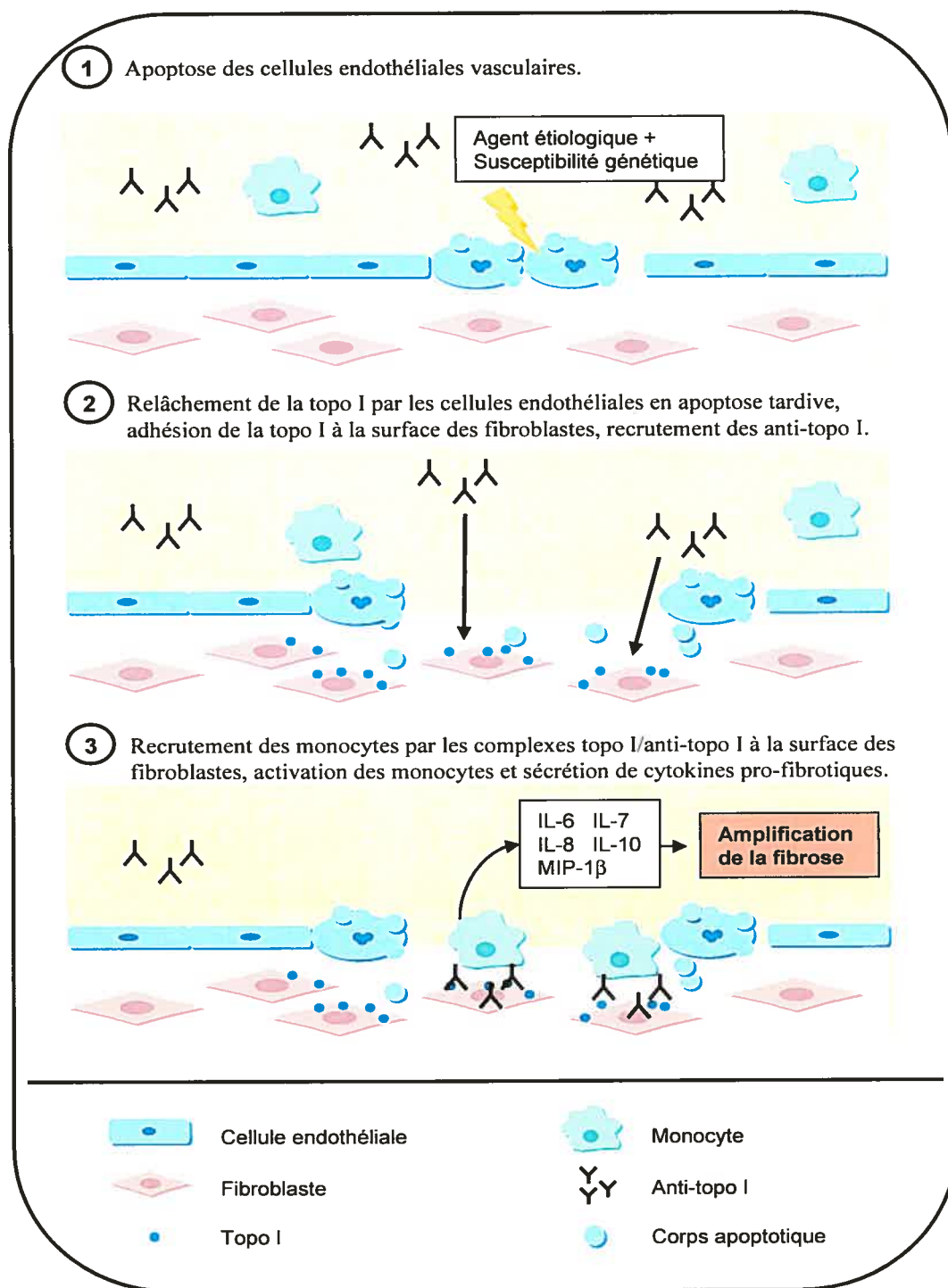


Figure 6. Hypothèse du rôle pathogénique des anti-topo I dans la Scl.

Ainsi donc, les résultats de notre étude suggèrent que les anti-topo I jouent un rôle pathogénique dans la Scl et causent, par le recrutement de cellules monocytaires, un phénomène d'amplification de la réponse inflammatoire et de la fibrose tissulaire (Fig. 7).

L'implication des anti-topo I dans un phénomène d'amplification des réponses pro-inflammatoires et pro-fibrotiques pourrait expliquer que la présence de ces auto-anticorps, chez les patients atteints de Scl, soit généralement associée à une forme plus sévère de la maladie (12;13;83;340).

L'hypothèse d'un rôle pathogénique des anti-topo I dans la Scl est soutenue par de nombreuses observations. Par exemple, plusieurs études faites chez des patients sclérodermiques ont démontré une étroite corrélation entre les niveaux d'anti-topo I en circulation et l'intensité de la fibrose cutanée (11;12;15). L'une de ces études, faite par Hu et son équipe, démontre même que les titres sériques d'anti-topo I sont plus élevés chez les patients ayant une fibrose active que chez les patients avec une fibrose inactive et que les titres sériques d'anti-topo I fluctuent en parallèle avec l'épaisseur de la peau chez certains patients (12). Chez un patient en particulier, les variations des titres sériques d'anti-topo I avaient précédé les variations de l'épaisseur de la peau, suggérant une relation de cause à effet (12).

Une association entre les niveaux d'anti-topo I en circulation et l'intensité des contractures a également été observée chez des patients sclérodermiques souffrant de contracture en flexion des phalanges proximales (PIP) et/ou des phalanges métacarpiennes (MCP) (14).

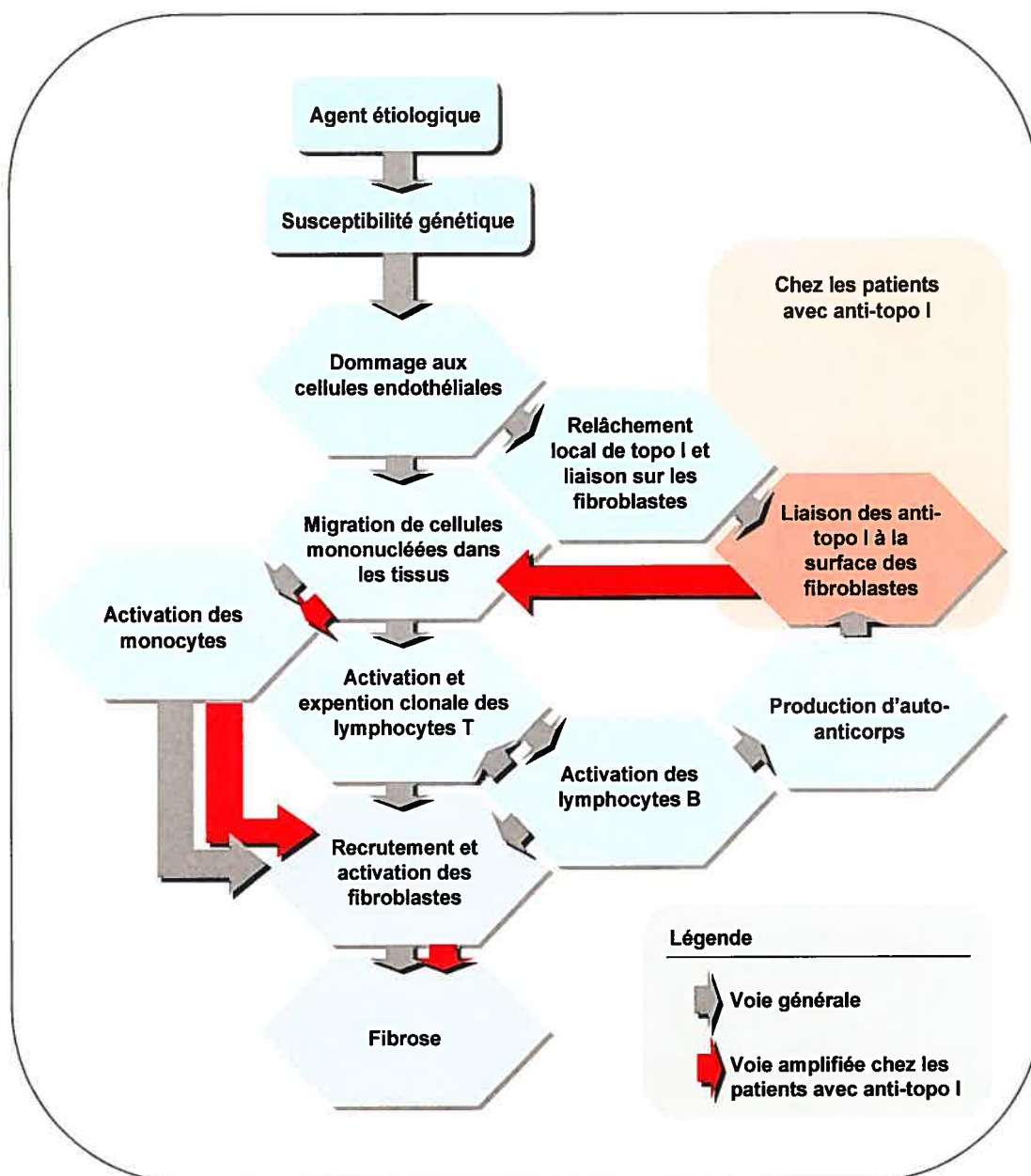


Figure 7. Hypothèse de l'amplification des réponses pro-inflammatoires et pro-fibrotiques chez les patients sclérodermiques avec anti-topo I.

Une des complications les plus graves associées à la présence d'anti-topo I dans la Scl est la fibrose pulmonaire, ou pneumopathie interstitielle chronique fibrosante (PICF) (341). Or, il a été démontré que les patients avec de hauts niveaux d'anti-topo I sont plus susceptibles de développer une PICF que les patients avec de faibles niveaux d'anti-topo I (11).

Étonnamment, les patients sclérodermiques qui cessent de produire des anti-topo I voient leur fonction pulmonaire ainsi que leur survie s'améliorer de façon significative, comparativement aux patients chez qui l'expression des anti-topo I persiste (13).

Ainsi, en accord avec notre hypothèse, la présence d'anti-topo I chez les patients sclérodermiques semble exacerber l'inflammation et la fibrose de façon dose-dépendante, tandis qu'une perte d'expression de ces auto-anticorps semble permettre aux réponses pro-inflammatoires et pro-fibrotiques de se résorber.

Vérification de la pathogénécité des anti-topo I *in vivo*

Les résultats de notre étude démontrent que les anti-topo I de patients sclérodermiques ont le potentiel de jouer un rôle dans la pathogénèse de la Scl. Pour confirmer le rôle pathogénique de ces auto-anticorps dans la Scl, il faudrait : 1) démontrer leur présence dans les tissus lésionnels et 2) démontrer que le transfert passif de ces auto-anticorps induit un phénotype associé à la présence d'anti-topo I et/ou démontrer que le retrait sélectif de ces auto-anticorps se traduit par une amélioration de la maladie.

L'infiltration d'anti-topo I dans les tissus de patients sclérodermiques pourrait être vérifiée par immunoprécipitation et caractérisation par immunobuvardage des IgG présents dans des biopsies de peau lésionnelle. Ainsi, les IgG présents dans les tissus homogénéisés pourraient être immunoprécipitées avec des protéines G et testées pour leur réactivité contre de la topo I immobilisée sur une membrane de nitrocellulose. Cette technique a déjà été utilisée, entre autres, pour démontrer l'infiltration d'auto-anticorps anti-cardiomyocytes dans les tissus du muscle cardiaque chez la souris (342).

Traditionnellement, la technique la plus directe pour prouver la pathogénicité d'un anticorps est le transfert passif. Si l'anticorps est bel et bien l'agent pathogène, le récipient développe des symptômes similaires au donneur. Pour des raisons évidentes, cette technique requiert l'utilisation d'un modèle animal.

Parmi les modèles animaux de la Scl, trois produisent des anti-topo I : la souris «Tight Skin» de type I (Tsk1) (343) et de type 2 (Tsk2) (344) de même que la souris «graft-vs-host disease»-modifiée (GVHDmod) (345).

Chez la souris Tsk1, une mutation du gène de la fibrilline-1 entraîne une accumulation désordonnée de MEC dans les tissus qui rappelle celle observée chez les patients avec Scl (346). De plus, cette souris produit de grandes quantités d'anti-topo I (216;340;347). Toutefois, une augmentation des titres sériques d'anti-topo I chez la souris Tsk1, causée par une surexpression de CD19 à la surface des LB, n'entraîne pas une augmentation significative de dépôt de collagène dans les tissus (348). Ce résultat découle probablement du fait qu'il existe des différences marquées quant aux mécanismes fibrogéniques entre la souris Tsk1 et les patients

sclérodermiques. Par exemple, chez la souris Tsk1, aucune infiltration de cellules mononucléées n'est détectée dans les tissus (349) et le développement de la fibrose est indépendant de la présence des lymphocytes (346), ce qui est le contraire chez l'humain (voir Introduction, section 2.5). Notre modèle de pathogénécité des anti-topo I dépend largement de la présence de la composante immunitaire (Fig. 6 et 7). La souris Tsk1 ne conviendrait donc pas pour vérifier le rôle pathogénique des anti-topo I.

La souris Tsk2 résulte d'une mutation induite sur le chromosome 1 (344). Tout comme les patients sclérodermiques, cette souris présente des accumulations de collagène ainsi que des infiltrations de cellules mononucléées dans les tissus (350). De plus, la souris Tsk2 développe plusieurs ANA, dont des anti-topo I et des anti-CENP-B (344). Cependant, contrairement à ce qui est observé dans la Scl, la majorité des souris Tsk2 (86,6 %) développe simultanément des anti-topo I et des anti-CENP-B. Ces deux ANA sont, en effet, mutuellement exclusifs chez les patients sclérodermiques (voir Introduction, section 3.1). La majorité des souris Tsk2 développe également des anti-ADNdb, un ANA associé au SLE (344). D'autres différences entre la Scl et la souris Tsk2 incluent l'absence de dommage au niveau de la microvasculature (351), l'absence de fibrose pulmonaire chez les souris anti-topo I positives ainsi que l'absence de corrélation entre les titres sériques d'anti-topo I et l'épaisseur de la peau (344). Ainsi donc, il existe des différences marquées entre la souris Tsk2 et la Scl quant aux composantes immunitaires et vasculaires de la maladie. Tout comme la souris Tsk1, la souris Tsk2 ne serait pas un modèle convenable pour tester la pathogénécité des anti-topo I.

La souris GVHDmod est une variante de la GVHD sclérodermiiforme murine traditionnelle (Scl-GVHD). Alors que la Scl-GVHD est induite par une transplantation de moëlle osseuse et un transfert de cellules de la rate d'une souris B10.D2 (H-2^d) à une souris BALB/c (H-2^d) irradiée (352), la GVHDmod est induite uniquement par un transfert de cellules de la rate d'une souris B10.D2 (H-2^d) à une souris BALB/c (H-2^d) RAG-2KO (déficiente en LT et LB matures) (345). Ce modèle a l'avantage de reproduire les trois aspects principaux de la dScl, c'est-à-dire une altération de la microvasculature, une fibrose cutanée et systémique (atteintes rénales et intestinales) et un dérèglement de la réponse immunitaire. Tout comme chez les patients avec Scl, la souris GVHDmod présente une infiltration de cellules mononucléées dans les tissus. Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans la Scl, environ 90 % des souris développent des anti-topo I et la présence de ces anticorps n'est pas associée à de la fibrose pulmonaire (345).

Démontrer la pathogénécité des anti-topo I dans un modèle animal de la Scl pourrait s'avérer problématique. En effet, la présence d'anti-topo I chez les modèles animaux connus ne semble pas être associée à un phénotype distinct, comme c'est le cas chez les patients sclérodermiques (voir Introduction, section 3.1.1). De plus, bien que certains modèles produisent des anti-topo I, la prévalence de ces auto-anticorps ne correspond pas à celle observée chez les patients ($\geq 86,8\%$ vs 15 à 20 %, respectivement (41;50;81-83;343-345)). Ces données suggèrent qu'il existe des différences entre les mécanismes immunitaires impliqués dans la pathogénèse de la maladie chez l'humain et la souris.

La pathogénicité des anti-topo I pourrait être vérifiée directement chez l'humain. Une des alternatives au transfert passif pour tester la pathogénécité d'un anticorps est la déplétion sélective. Chez l'humain, la déplétion sélective d'anti-topo I en circulation pourrait se faire par immunoadsorption spécifique en utilisant la topo I comme immunoadsorbant. L'immunoadsorption spécifique est une technique qui a été utilisée pour le traitement de maladies autoimmunes comme la myasthénie grave (353) et la cardiopathie dilatée (354). Chez ces maladies, un retrait sélectif de certains auto-anticorps entraîne une amélioration notable de la maladie (353;354). Parallèlement, une diminution de la fibrose et/ou de l'inflammation chez les patients sclérodermiques suite à une déplétion sélective des anti-topo I démontrerait la pathogénicité de ces auto-anticorps.

Les résultats de notre étude démontrent clairement le potentiel pathogénique des anti-topo I et ouvrent la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques pour le traitement de la Scl. En effet, nos résultats suggèrent qu'une déplétion sélective des anti-topo I chez les patients sclérodermiques pourrait entraîner une diminution de la sévérité de la maladie. L'immunoadsorption sélective des anti-topo I aurait l'avantage d'être une thérapie ciblée qui bénéficierait aux patients souvent atteints de la forme la plus sévère de la maladie.

La topo I à la surface des fibroblastes

Dans notre modèle, la pathogénicité des anti-topo I dépend d'abord de leur liaison à la surface des fibroblastes. Comme nous l'avons démontré, cette liaison n'est possible qu'en présence de topo I, relâchée par des cellules perméabilisées ou en

apoptose (article #2, Fig. 1 et 5). Notre étude portant essentiellement sur les auto-anticorps, nous nous sommes très peu attardés aux rôles des auto-antigènes *per se*. Cependant, bien que nos résultats démontrent que la liaison de la topo I seule à la surface des fibroblastes n'est pas suffisante pour induire l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires (article #2, Fig. 4), il n'est pas exclu que cet auto-antigène puisse être impliqué dans d'autres mécanismes pro-inflammatoires et/ou pro-fibrotiques dans la Scl. Par exemple, il a été démontré que plusieurs auto-antigènes, dont la topo I, pouvaient agir comme agents chimiotactiques lorsque relâchés par des cellules endommagées ou en apoptose (244-246). En effet, la topo I peut induire la migration de Dc immatures en interagissant avec leurs récepteurs « Gi-protein coupled » (246). Il serait donc possible que la liaison de la topo I à la surface des fibroblastes induise la migration de Dc immatures dans les tissus.

La spécificité de la liaison de la topo I à la surface des fibroblastes est intrigante. Elle soulève la possibilité que les auto-antigènes puissent diriger une réponse immunitaire vers un type cellulaire ou un tissu spécifique par l'entremise de leurs auto-anticorps respectifs. Cette hypothèse pourrait expliquer que la présence de certains auto-anticorps soit généralement associée à un regroupement précis de manifestations pathophysiologiques dans la Scl.

Le rôle des auto-antigènes dans la Scl mériterait de faire l'objet d'études futures.

La cible de la topo I à la surface des fibroblastes

La grande inconnue de notre étude demeure la cible de la topo I à la surface des fibroblastes. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nous permettent de caractériser partiellement cette cible.

Le récepteur de la topo I est exprimé au niveau de la membrane cellulaire.

Des études par cytométrie en flux (article #2, Fig. 1C) et par microscopie confocale (annexe II, Fig. A5) sur des cellules vivantes et non perméabilisées nous ont permis de déterminer que le récepteur de la topo I se situe au niveau de la face externe de la membrane plasmique.

Le récepteur de la topo I a une distribution ponctuée à la surface des cellules.

Le patron de distribution de la cible de la topo I à la surface des cellules a été étudié par immunofluorescence indirecte (annexe I, Fig. A1) et par microscopie confocale (annexe II, Fig. A6). Les résultats obtenus montrent un patron de distribution ponctué et non homogène de la cible. Ce résultat suggère que le récepteur de la topo I se concentre dans des régions spécifiques de la membrane cellulaire, ou encore qu'il est recruté dans ces régions à la suite d'une liaison avec la topo I.

Le récepteur de la topo I est plus abondant chez les fibroblastes que chez tout autre type cellulaire.

Des études par ELISA cellulaire (article #2, Fig. 3) démontrent que le récepteur membranaire de la topo I est plus abondant chez les fibroblastes, indépendamment de leur tissu d'origine, que chez tous les autres types cellulaires testés. La spécificité d'expression du récepteur suggère son implication dans des fonctions ou des voies de signalisation propres aux fibroblastes.

Le récepteur de la topo I est une protéine.

La caractérisation de la nature du récepteur membranaire de la topo I a été faite par un test de dégradation enzymatique. La trypsine est une endopeptidase dont la fonction est d'hydrolyser les liens peptidiques des protéines au niveau des arginine et lysine (355). Par conséquent, le traitement de cellules vivantes avec de la trypsine entraîne une dégradation partielle des protéines de surfaces, résultant en une perte de fonction de la majorité de ces dernières. Nos données démontrent que les fibroblastes préalablement traités avec de la trypsine perdent la capacité de lier la topo I (article #2, Fig. 6A). La sensibilité du récepteur membranaire de la topo I à la trypsine indique que ce récepteur est de nature protéique, ou encore que sa fonction dépend d'une protéine. Nos données démontrent également que le récepteur membranaire de la topo I redevient disponible à la surface cellulaire moins de dix minutes après le retrait de la trypsine, ce qui suggère un trafic intracellulaire continu du récepteur.

L'expression du récepteur de la topo I à la surface des cellules est perturbée par la brefeldine A.

Nous avons tenté de caractériser la voie de transport et de sécrétion empruntée par le récepteur membranaire de la topo I. Le transport des protéines vers la surface cellulaire se fait majoritairement par la voie de transport et de sécrétion des protéines qui passe du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi, puis vers la membrane cytoplasmique via des vésicules de transport. La brefeldine A est un antibiotique qui interfère avec le transit des protéines du RE à l'appareil de Golgi (356). Or, nous avons observé que les fibroblastes préalablement traités avec de la brefeldine A ne réexpriment pas le récepteur de la topo I après le retrait de la trypsine

(article #2, Fig. 6B). Cette observation suggère que le récepteur de la topo I est exporté à la surface cellulaire via la voie de transport et de sécrétion passant par le RE et l'appareil de Golgi.

Le récepteur de la topo I est sensible à une désorganisation des radeaux lipidiques.

La distribution non homogène du récepteur membranaire de la topo I suggère sa concentration dans des régions spécifiques de la membrane plasmique. Parmi les microdomaines de la membrane cellulaire, on connaît les radeaux de lipides ou «lipid rafts». Les radeaux lipidiques sont des plateformes dynamiques de signalisation membranaire composées de lipides tels le cholestérol, les glycolipides et les sphingolipides, ainsi que de protéines, majoritairement à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (357-359). Pour vérifier la possibilité d'une association entre le récepteur membranaire de la topo I et les radeaux lipidiques, nous avons procédé à des études de déstabilisation des radeaux lipidiques. La méthyl-beta-cyclodextrine (M β C) est un oligosaccharide cyclique qui séquestre le cholestérol, perturbant ainsi la formation de radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique (360). Nous avons observé que les fibroblastes traités à la M β C perdent la capacité de lier la topo I (annexe II, Fig. A7). Ainsi, une désorganisation des radeaux lipidiques entraîne une perte d'accessibilité du récepteur membranaire de la topo I, suggérant une colocalisation des radeaux et du récepteur, ou du moins leur association fonctionnelle.

En résumé, les résultats préliminaires que nous avons obtenus indiquent que le déterminant membranaire auquel se lie la topo I est une protéine, ou un complexe

protéique, préférentiellement exprimé à la surface des fibroblastes et associé aux radeaux lipidiques.

Le recrutement de complexes topo I/anti-topo I à la surface de cellules via un récepteur membranaire n'est pas un cas unique. En effet, il a été démontré que les nucléosomes, des complexes formés d'ADN et d'histones, peuvent également lier la surface cellulaire via une protéine membranaire et recruter des auto-anticorps anti-ADN (361;362). Bien que deux protéines candidates (94 kDa (361) et 50 kDa (363)) aient été isolées, l'identité de la cible des nucléosomes à la surface des cellules demeure inconnue.

Notre caractérisation du récepteur de la topo I à la surface des fibroblastes est encore partielle et il est évident que de nouvelles expérimentations seront nécessaires à son identification.

Conclusion et perspectives

L'étude présentée dans cette thèse avait pour but d'examiner le rôle pathogénique des auto-anticorps, et plus particulièrement des ANA, dans la Scl. Nos résultats démontrent que les anti-topo I, des ANA spécifiques à la Scl, peuvent induire le recrutement et l'activation de cellules monocytaires lorsqu'ils forment des complexes topo I/anti-topo I à la surface des fibroblastes.

Bien que des corrélations étroites entre les titres sériques d'anti-topo I et l'activité de la Scl aient été observées dans de précédentes études, l'implication des anti-topo I dans les mécanismes liés aux manifestations pathophysiologiques de la Scl restait matière à spéculation.

Les résultats de notre étude amènent pour la première fois des preuves tangibles du potentiel pathogénique des anti-topo I dans la Scl et nous permettent de suggérer un modèle de pathogénicité dans lequel ces auto-anticorps participent à des mécanismes d'amplification des réponses pro-inflammatoires et pro-fibrotiques impliquées dans la maladie. Notre modèle d'exacerbation de la fibrose par les anti-topo I expliquerait entre autres que la présence de ces auto-anticorps chez les patients sclérodermiques soit associée à une forme plus sévère de la maladie.

De façon intéressante, notre étude sur les auto-anticorps nous a également permis de démontrer que la topo I, une enzyme intra-nucléaire impliquée dans les mécanismes de réplication de l'ADN, peut être relâchée par des cellules endommagées ou en apoptose et se lier spécifiquement à la surface des fibroblastes par l'entremise d'un

récepteur membranaire. Cette observation soulève l'hypothèse d'un rôle actif de certains auto-antigènes dans la Scl.

Bien que notre étude amène quelques réponses sur le rôle pathogénique des ANA dans la Scl, elle soulève également de nombreuses questions que de futures études devront aborder. Par exemple:

1. La pathogénicité des ANA dans la Scl peut-elle être démontrée *in vivo* ?
2. Pourquoi les ANA sont-ils associés à des regroupements de manifestations pathophysiologiques spécifiques ?
3. Quel est le rôle des auto-antigènes intra-nucléaires dans la Scl ?
4. Quelle est l'identité du récepteur membranaire de la topo I à la surface des fibroblastes ? Quels sont les effets de la liaison de la topo I à ce récepteur ?

Notre étude ouvre la porte à une reconsidération du rôle des ANA ainsi que des auto-antigènes intranucléaires dans la Scl. Elle ouvre également la voie à de nouvelles options thérapeutiques, plus ciblées, pour une maladie, et surtout pour des patients, qui en ont grand besoin.

Bibliographie

1. Charles,C., Clements,P., and Furst,D.E. 2006. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet*. 20;367:1683-1691.
2. Denton,C.P., and Black,C.M. 2005. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol*. 26:596-602.
3. Reveille,J.D., and Solomon,D.H. 2003. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 49:399-412.
4. Brentnall,T.J., Kenneally,D., Barnett,A.J., de Aizpurua,H.J., Lolait,S.J., Ashcroft,R., and Toh,B.H. 1982. Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. *J. Clin. Lab Immunol*. 8:9-12.
5. Chizzolini,C., Raschi,E., Rezzonico,R., Testoni,C., Mallone,R., Gabrielli,A., Facchini,A., Del,P.N., Borghi,M.O., Dayer,J.M. et al 2002. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 46:1602-1613.
6. Hesselstrand,R., Scheja,A., Shen,G.Q., Wiik,A., and Akesson,A. 2003. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology. (Oxford)* 42:534-540.
7. Ronda,N., Gatti,R., Giacosa,R., Raschi,E., Testoni,C., Meroni,P.L., Buzio,C., and Orlandini,G. 2002. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum*. 46:1595-1601.
8. Rosenbaum,J., Pottinger,B.E., Woo,P., Black,C.M., Loizou,S., Byron,M.A., and Pearson,J.D. 1988. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin. Exp. Immunol*. 72:450-456.
9. Sgonc,R., Gruschwitz,M.S., Boeck,G., Sepp,N., Gruber,J., and Wick,G. 2000. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum*. 43:2550-2562.
10. Zhou,X., Tan,F.K., Milewicz,D.M., Guo,X., Bona,C.A., and Arnett,F.C. 2005. Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF-beta pathway to recapitulate the "scleroderma phenotype". *J. Immunol*. 175:4555-4560.
11. Diot,E., Giraudeau,B., Diot,P., Degenne,D., Ritz,L., Guilmot,J.L., and Lemarie,E. 1999. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest* 116:715-720.
12. Hu,P.Q., Fertig,N., Medsger,T.A., Jr., and Wright,T.M. 2003. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 48:1363-1373.

13. Kuwana,M., Kaburaki,J., Mimori,T., Kawakami,Y., and Tojo,T. 2000. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43:1074-1084.
14. Radic,M., Martinovic,K.D., and Ljutic,D. 2006. The level of anti-topoisomerase I antibodies highly correlates with metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints flexion contractures in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24:407-412.
15. Sato,S., Hamaguchi,Y., Hasegawa,M., and Takehara,K. 2001. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology. (Oxford)* 40:1135-1140.
16. Ignatowicz,L., Kappler,J., and Marrack,P. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell.* 84:521-529.
17. Zerrahn,J., Held,W., and Raulet,D.H. 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell.* 88:627-636.
18. Wardemann,H., Yurasov,S., Schaefer,A., Young,J.W., Meffre,E., and Nussenzweig,M.C. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science.* 301:1374-1377.
19. Nemazee,D., and Hogquist,K.A. 2003. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 15:182-189.
20. Schwartz,R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21:305-34.
21. Grossman,Z., and Paul,W.E. 2000. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin. Immunol.* 12:197-203.
22. Bluestone,J.A., and Tang,Q. 2005. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.* 17:638-642.
23. Wekerle,H. 1992. Myelin specific, autoaggressive T cell clones in the normal immune repertoire: their nature and their regulation. *Int. Rev. Immunol.* 9:231-241.
24. Tsuiji,M., Yurasov,S., Velinzon,K., Thomas,S., Nussenzweig,M.C., and Wardemann,H. 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J. Exp. Med.* 203:393-400.
25. Jacobson,D.L., Gange,S.J., Rose,N.R., and Graham,N.M. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84:223-243.
26. Nagamine,K., Peterson,P., Scott,H.S., Kudoh,J., Minoshima,S., Heino,M., Krohn,K.J., Lalioti,M.D., Mullis,P.E., Antonarakis,S.E. et al 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 17:393-398.
27. Kuroda,N., Mitani,T., Takeda,N., Ishimaru,N., Arakaki,R., Hayashi,Y., Bando,Y., Izumi,K., Takahashi,T., Nomura,T. et al 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepresed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* 174:1862-1870.

28. Uchida,D., Hatakeyama,S., Matsushima,A., Han,H., Ishido,S., Hotta,H., Kudoh,J., Shimizu,N., Doucas,V., Nakayama,K.I. et al 2004. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J. Exp. Med.*199:167-172.
29. Liston,A., Gray,D.H., Lesage,S., Fletcher,A.L., Wilson,J., Webster,K.E., Scott,H.S., Boyd,R.L., Peltonen,L., and Goodnow,C.C. 2004. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200:1015-1026.
30. Bennett,C.L., Christie,J., Ramsdell,F., Brunkow,M.E., Ferguson,P.J., Whitesell,L., Kelly,T.E., Saulsbury,F.T., Chance,P.F., and Ochs,H.D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20-21.
31. Chen,W., Jin,W., Hardegen,N., Lei,K.J., Li,L., Marinos,N., McGrady,G., and Wahl,S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198:1875-1886.
32. Bacchetta,R., Passerini,L., Gambineri,E., Dai,M., Allan,S.E., Perroni,L., gna-Bricarelli,F., Sartirana,C., Matthes-Martin,S., Lawitschka,A. et al 2006. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 116:1713-1722.
33. Fairweather,D., Kaya,Z., Shellam,G.R., Lawson,C.M., and Rose,N.R. 2001. From infection to autoimmunity. *J. Autoimmun.* 16:175-186.
34. Ganss,R., Limmer,A., Sacher,T., Arnold,B., and Hammerling,G.J. 1999. Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. *Immunol. Rev.* 169:263-72.
35. Zinkernagel,R.M., Ehl,S., Aichele,P., Oehen,S., Kundig,T., and Hengartner,H. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* 156:199-209.
36. Horwitz,M.S., La,C.A., Fine,C., Rodriguez,E., Ilic,A., and Sarvetnick,N. 2000. Pancreatic expression of interferon-gamma protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Nat. Med.* 6:693-697.
37. Mouthon,L., Garcia de la Pena-Lefebvre, Chanseaud,Y., Tamby,M.C., Boissier,M.C., and Guillevin,L. 2002. Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects. *Ann. Med. Interne (Paris)* 153:167-178.
38. 1980. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 23:581-590.
39. LeRoy,E.C., and Medsger,T.A., Jr. 2001. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 28:1573-1576.
40. LeRoy,E.C., Black,C., Fleischmajer,R., Jablonska,S., Krieg,T., Medsger,T.A., Jr., Rowell,N., and Wollheim,F. 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:202-205.

41. Steen,V.D., Powell,D.L., and Medsger,T.A., Jr. 1988. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 31:196-203.
42. Merkel,P.A., Herlyn,K., Martin,R.W., Anderson,J.J., Mayes,M.D., Bell,P., Korn,J.H., Simms,R.W., Csuka,M.E., Medsger,T.A., Jr. et al 2002. Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 46:2410-2420.
43. Geirsson,A.J., Wollheim,F.A., and Akesson,A. 2001. Disease severity of 100 patients with systemic sclerosis over a period of 14 years: using a modified Medsger scale. *Ann. Rheum. Dis.* 60:1117-1122.
44. Steen,V.D., and Medsger,T.A., Jr. 2000. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 43:2437-2444.
45. Steen,V.D., Medsger,T.A., Jr., Osial,T.A., Jr., Ziegler,G.L., Shapiro,A.P., and Rodnan,G.P. 1984. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am. J. Med.* 76:779-786.
46. Koh,E.T., Lee,P., Gladman,D.D., and bu-Shakra,M. 1996. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. *Br. J. Rheumatol.* 35:989-993.
47. Altman,R.D., Medsger,T.A., Jr., Bloch,D.A., and Michel,B.A. 1991. Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 34:403-413.
48. Barnett,A.J., Miller,M.H., and Littlejohn,G.O. 1988. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953-1983): the value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. *J. Rheumatol.* 15:276-283.
49. Medsger,T.A., Jr., Masi,A.T., Rodnan,G.P., Benedek,T.G., and Robinson,H. 1971. Survival with systemic sclerosis (scleroderma). A life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann. Intern. Med.* 75:369-376.
50. Scussel-Lonzetti,L., Joyal,F., Raynald,J.P., Roussin,A., Rich,E., Goulet,J.R., Raymond,Y., and Senecal,J.L. 2002. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)* 81:154-167.
51. Silman,A.J. 1997. Scleroderma--demographics and survival. *J. Rheumatol. Suppl.* 48:58-61.
52. Medsger,T.A., Jr., and Masi,A.T. 1971. Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Intern. Med.* 74:714-721.
53. Mayes,M.D. 1997. Epidemiology of systemic sclerosis and related diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 9:557-561.
54. Steen,V.D., Oddis,C.V., Conte,C.G., Janoski,J., Casterline,G.Z., and Medsger,T.A., Jr. 1997. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum.* 40:441-445.
55. Michet,C.J., Jr., McKenna,C.H., Elveback,L.R., Kaslow,R.A., and Kurland,L.T. 1985. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin. Proc.* 60:105-113.

56. Maricq,H.R., Weinrich,M.C., Keil,J.E., Smith,E.A., Harper,F.E., Nussbaum,A.I., LeRoy,E.C., McGregor,A.R., Diat,F., and Rosal,E.J. 1989. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum.* 32:998-1006.
57. Mayes,M.D., Lacey,J.V., Jr., Beebe-Dimmer,J., Gillespie,B.W., Cooper,B., Laing,T.J., and Schottenfeld,D. 2003. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 48:2246-2255.
58. Silman,A., Jannini,S., Symmons,D., and Bacon,P. 1988. An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. *Br. J. Rheumatol.* 27:286-290.
59. Roberts-Thomson,P.J., Jones,M., Hakendorf,P., Kencana Dharmapatni,A.A., Walker,J.G., MacFarlane,J.G., Smith,M.D., and Ahern,M.J. 2001. Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance. *Intern. Med. J.* 31:220-229.
60. Arnett,F.C., Howard,R.F., Tan,F., Moulds,J.M., Bias,W.B., Durban,E., Cameron,H.D., Paxton,G., Hodge,T.J., Weathers,P.E. et al 1996. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* 39:1362-1370.
61. Ansell,B.M., Nasseh,G.A., and Bywaters,E.G. 1976. Scleroderma in childhood. *Ann. Rheum. Dis.* 35:189-197.
62. Dalziel,J.A., and Wilcock,G.K. 1979. Progressive systemic sclerosis in the elderly. *Postgrad. Med. J.* 55:192-193.
63. Czirjak,L., Nagy,Z., and Szegedi,G. 1992. Systemic sclerosis in the elderly. *Clin. Rheumatol.* 11:483-485.
64. Magnant,J., de,M.M., Guilmot,J.L., Lasfargues,G., Diot,P., Asquier,E., Degenne,D., Boissinot,E., and Diot,E. 2005. Relationship between occupational risk factors and severity markers of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 32:1713-1718.
65. Feghali-Bostwick,C., Medsger,T.A., Jr., and Wright,T.M. 2003. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 48:1956-1963.
66. McGregor,A.R., Watson,A., Yunis,E., Pandey,J.P., Takehara,K., Tidwell,J.T., Ruggieri,A., Silver,R.M., LeRoy,E.C., and Maricq,H.R. 1988. Familial clustering of scleroderma spectrum disease. *Am. J. Med.* 84:1023-1032.
67. Arnett,F.C., Cho,M., Chatterjee,S., Aguilar,M.B., Reveille,J.D., and Mayes,M.D. 2001. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 44:1359-1362.
68. Zhou,X., Tan,F.K., Xiong,M., Arnett,F.C., and Feghali-Bostwick,C.A. 2005. Monozygotic twins clinically discordant for scleroderma show concordance for fibroblast gene expression profiles. *Arthritis Rheum.* 52:3305-3314.
69. Reveille,J.D. 1995. Molecular genetics of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 7:522-528.

70. Briggs,D., Stephens,C., Vaughan,R., Welsh,K., and Black,C. 1993. A molecular and serologic analysis of the major histocompatibility complex and complement component C4 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 36:943-954.
71. Akimoto,S., Abe,M., and Ishikawa,O. 2000. HLA-DRB1 and DQB1 genes in Japanese patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 27:2940-2942.
72. Kang,S.H., Park,M.H., Song,E.Y., Kang,S.J., Lee,E.B., Song,Y.W., and Takeuchi,F. 2001. Association of HLA class II genes with systemic sclerosis in Koreans. *J. Rheumatol.* 28:1577-1583.
73. Lambert,N.C., Distler,O., Muller-Ladner,U., Tylee,T.S., Furst,D.E., and Nelson,J.L. 2000. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum.* 43:2005-2010.
74. Reveille,J.D., Fischbach,M., McNearney,T., Friedman,A.W., Aguilar,M.B., Lisse,J., Fritzler,M.J., Ahn,C., and Arnett,F.C. 2001. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin. Arthritis Rheum.* 30:332-346.
75. Susol,E., Rands,A.L., Herrick,A., McHugh,N., Barrett,J.H., Ollier,W.E., and Worthington,J. 2000. Association of markers for TGFbeta3, TGFbeta2 and TIMP1 with systemic sclerosis. *Rheumatology. (Oxford).* 39:1332-1336.
76. Tan,F.K., Stivers,D.N., Foster,M.W., Chakraborty,R., Howard,R.F., Milewicz,D.M., and Arnett,F.C. 1998. Association of microsatellite markers near the fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a Native American population. *Arthritis Rheum.* 41:1729-1737.
77. Tan,F.K., Wang,N., Kuwana,M., Chakraborty,R., Bona,C.A., Milewicz,D.M., and Arnett,F.C. 2001. Association of fibrillin 1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with systemic sclerosis in Choctaw and Japanese populations. *Arthritis Rheum.* 44:893-901.
78. Zhou,X., Tan,F.K., Reveille,J.D., Wallis,D., Milewicz,D.M., Ahn,C., Wang,A., and Arnett,F.C. 2002. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum.* 46:2990-2999.
79. Artlett,C.M., Smith,J.B., and Jimenez,S.A. 1998. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338:1186-1191.
80. Nelson,J.L., Furst,D.E., Maloney,S., Gooley,T., Evans,P.C., Smith,A., Bean,M.A., Ober,C., and Bianchi,D.W. 1998. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351:559-562.
81. Ferri,C., Valentini,G., Cozzi,F., Sebastiani,M., Michelassi,C., La,M.G., Bullo,A., Cazzato,M., Tirri,E., Storino,F. et al 2002. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore).* 81:139-153.
82. Shero,J.H., Bordwell,B., Rothfield,N.F., and Earnshaw,W.C. 1986. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 231:737-740.

83. Weiner,E.S., Earnshaw,W.C., Senecal,J.L., Bordwell,B., Johnson,P., and Rothfield,N.F. 1988. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum.* 31:378-385.
84. Catoggio,L.J., Bernstein,R.M., Black,C.M., Hughes,G.R., and Maddison,P.J. 1983. Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations. *Ann. Rheum. Dis.* 42:23-27.
85. Earnshaw,W., Bordwell,B., Marino,C., and Rothfield,N. 1986. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J. Clin. Invest* 77:426-430.
86. Fritzler,M.J., and Kinsella,T.D. 1980. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am. J. Med.* 69:520-526.
87. Mitri,G.M., Lucas,M., Fertig,N., Steen,V.D., and Medsger,T.A., Jr. 2003. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 48:203-209.
88. Rothfield,N., Whitaker,D., Bordwell,B., Weiner,E., Senecal,J.L., and Earnshaw,W. 1987. Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Arthritis Rheum.* 30:1416-1419.
89. Tan,E.M., Rodnan,G.P., Garcia,I., Moroi,Y., Fritzler,M.J., and Peebles,C. 1980. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 23:617-625.
90. Bunn,C.C., Denton,C.P., Shi-Wen,X., Knight,C., and Black,C.M. 1998. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br. J. Rheumatol.* 37:15-20.
91. Harvey,G.R., and McHugh,N.J. 1999. Serologic abnormalities in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 11:495-502.
92. Kuwana,M., Kaburaki,J., Mimori,T., Tojo,T., and Homma,M. 1993. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest* 91:1399-1404.
93. Okano,Y., Steen,V.D., and Medsger,T.A., Jr. 1993. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* 119:1005-1013.
94. Falkner,D., Wilson,J., Medsger,T.A., Jr., and Morel,P.A. 1998. HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum.* 41:74-80.
95. Kuwana,M., Kimura,K., Hirakata,M., Kawakami,Y., and Ikeda,Y. 2002. Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 61:842-846.
96. Okano,Y., and Medsger,T.A., Jr. 1990. Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 33:1822-1828.

97. Reimer,G., Steen,V.D., Penning,C.A., Medsger,T.A., Jr., and Tan,E.M. 1988. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 31:525-532.
98. Van,E.H., Vogelzangs,J.H., Lugtenberg,D., Van Den Hoogen,F.H., van Venrooij,W.J., and Pruijn,G.J. 2002. Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum.* 46:3266-3272.
99. Fischer,A., Pfalzgraf,F.J., Feghali-Bostwick,C.A., Wright,T.M., Curran-Everett,D., West,S.G., and Brown,K.K. 2006. Anti-Th/To-Positivity in a Cohort of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Rheumatol.*33:1600-1605.
100. Alderuccio,F., Chan,E.K., and Tan,E.M. 1991. Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the polymyositis/scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex. *J. Exp. Med.* 173:941-952.
101. Oddis,C.V., Okano,Y., Rudert,W.A., Trucco,M., Duquesnoy,R.J., and Medsger,T.A., Jr. 1992. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum.* 35:1211-1217.
102. Raijmakers,R., Renz,M., Wiemann,C., Egberts,W.V., Seelig,H.P., van Venrooij,W.J., and Pruijn,G.J. 2004. PM-Scl-75 is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome. *Arthritis Rheum.* 50:565-569.
103. Reimer,G., Scheer,U., Peters,J.M., and Tan,E.M. 1986. Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J. Immunol.* 137:3802-3808.
104. Targoff,I.N. 2002. Idiopathic inflammatory myopathy: autoantibody update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 4:434-441.
105. Arnett,F.C., Reveille,J.D., Goldstein,R., Pollard,K.M., Leaird,K., Smith,E.A., LeRoy,E.C., and Fritzler,M.J. 1996. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum.* 39:1151-1160.
106. Okano,Y., Steen,V.D., and Medsger,T.A., Jr. 1992. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 35:95-100.
107. Sacks,D.G., Okano,Y., Steen,V.D., Curtiss,E., Shapiro,L.S., and Medsger,T.A., Jr. 1996. Isolated pulmonary hypertension in systemic sclerosis with diffuse cutaneous involvement: association with serum anti-U3RNP antibody. *J. Rheumatol.* 23:639-642.
108. Steen,V., and Medsger,T.A., Jr. 2003. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 48:516-522.
109. Yang,J.M., Hildebrandt,B., Luderschmidt,C., and Pollard,K.M. 2003. Human scleroderma sera contain autoantibodies to protein components specific to the U3 small nucleolar RNP complex. *Arthritis Rheum.* 48:210-217.
110. von Muhlen,C.A., and Tan,E.M. 1995. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 24:323-358.

111. Burdt,M.A., Hoffman,R.W., Deutscher,S.L., Wang,G.S., Johnson,J.C., and Sharp,G.C. 1999. Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum.* 42:899-909.
112. Ulanet,D.B., Wigley,F.M., Gelber,A.C., and Rosen,A. 2003. Autoantibodies against B23, a nucleolar phosphoprotein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum.* 49:85-92.
113. Dagher,J.H., Scheer,U., Voit,R., Grummt,I., Lonzetti,L., Raymond,Y., and Senecal,J.L. 2002. Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J. Rheumatol.* 29:1543-1547.
114. FENNEL,R.H., Jr., Rodnan,G.P., and VAZQUEZ,J.J. 1962. Variability of tissue-localizing properties of serum from patients with different disease states. *Lab Invest* 2:24-31.
115. BECK,J.S., ANDERSON,J.R., GRAY,K.G., and ROWELL,N.R. 1963. Antinuclear and precipitating autoantibodies in progressive systemic sclerosis. *Lancet* 41:1188-1190.
116. Douvas,A.S., Achten,M., and Tan,E.M. 1979. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522.
117. Guldner,H.H., Szostecki,C., Vosberg,H.P., Lakomek,H.J., Penner,E., and Bautz,F.A. 1986. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138.
118. Champoux,J.J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70:369-413.
119. Redinbo,M.R., Stewart,L., Kuhn,P., Champoux,J.J., and Hol,W.G. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 279:1504-1513.
120. Stewart,L., Ireton,G.C., Parker,L.H., Madden,K.R., and Champoux,J.J. 1996. Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 271:7593-7601.
121. Alsner,J., Svejstrup,J.Q., Kjeldsen,E., Sorensen,B.S., and Westergaard,O. 1992. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J. Biol. Chem.* 267:12408-12411.
122. Kuwana,M., Kaburaki,J., Medsger,T.A., Jr., and Wright,T.M. 1999. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum.* 42:1179-1188.
123. Piccinini,G., Cardellini,E., Reimer,G., Arnett,F.C., and Durban,E. 1991. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol. Immunol.* 28:333-339.
124. Kato,T., Yamamoto,K., Takeuchi,H., Okubo,M., Hara,E., Nakada,S., Oda,K., Ito,K., and Nishioka,K. 1993. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 36:1580-1587.

125. Henry,P.A., Atamas,S.P., Yurovsky,V.V., Luzina,I., Wigley,F.M., and White,B. 2000. Diversity and plasticity of the anti-DNA topoisomerase I autoantibody response in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 43:2733-2742.
126. Takehara,K., Moroi,Y., and Ishibashi,Y. 1985. Antinuclear antibodies in the relatives of patients with systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* 112:23-33.
127. Spencer-Green,G., Alter,D., and Welch,H.G. 1997. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am. J. Med.* 103:242-248.
128. Aeschlimann,A., Meyer,O., Bourgeois,P., Haim,T., Belmatoug,N., Palazzo,E., and Kahn,M.F. 1989. Anti-Scl-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann. Rheum. Dis.* 48:992-997.
129. Clegg,D.O., Williams,H.J., Singer,J.Z., Steen,V.D., Schlegel,S., Ziminski,C., Alarcon,G.S., Luggen,M.E., Polisson,R.P., Willkens,R.F. et al 1991. Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 18:1340-1343.
130. Ferri,C., Bernini,L., Cecchetti,R., Latorraca,A., Marotta,G., Pasero,G., Neri,R., and Bombardieri,S. 1991. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 18:1826-1832.
131. Jarzabek-Chorzelska,M., Blaszczyk,M., Kolacinska-Strasz,Z., Jablonska,S., Chorzelski,T., and Maul,G.G. 1990. Are ACA and Scl 70 antibodies mutually exclusive? *Br. J. Dermatol.* 122:201-208.
132. McNeilage,L.J., Youngchaiyud,U., and Whittingham,S. 1989. Racial differences in antinuclear antibody patterns and clinical manifestations of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 32:54-60.
133. Wollersheim,H., Thien,T., Hoet,M.H., and Van Venrooy,W.J. 1989. The diagnostic value of several immunological tests for anti-nuclear antibody in predicting the development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon. *Eur. J. Clin. Invest* 19:535-541.
134. Kallenberg,C.G., Wouda,A.A., Hoet,M.H., and van Venrooij,W.J. 1988. Development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon: a six year follow up with emphasis on the predictive value of antinuclear antibodies as detected by immunoblotting. *Ann. Rheum. Dis.* 47:634-641.
135. Jacobsen,S., Ullman,S., Shen,G.Q., Wiik,A., and Halberg,P. 2001. Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 28:2454-2459.
136. Murata,I., Takenaka,K., Shinohara,S., Suzuki,T., Sasaki,T., and Yamamoto,K. 1998. Diversity of myocardial involvement in systemic sclerosis: an 8-year study of 95 Japanese patients. *Am. Heart J.* 135:960-969.
137. de Rooij,D.J., Van de Putte,L.B., Habets,W.J., and van Venrooij,W.J. 1989. Marker antibodies in scleroderma and polymyositis: clinical associations. *Clin. Rheumatol.* 8:231-237.

138. Gilchrist,F.C., Bunn,C., Foley,P.J., Lympny,P.A., Black,C.M., Welsh,K.I., and du Bois,R.M. 2001. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun.* 2:76-81.
139. Clements,P.J., and Furst,D.E. 2003. Epidemiology, demographics, and genetics of systemic sclerosis. In *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Lippincott. Williams. & Wilkins.
140. Ford,A.L., Kurien,B.T., Harley,J.B., and Scofield,R.H. 1998. Anti-centromere autoantibody in a patient evolving from a lupus/Sjogren's overlap to the CREST variant of scleroderma. *J. Rheumatol.* 25:1419-1424.
141. Rattner,J.B., Rees,J., Arnett,F.C., Reveille,J.D., Goldstein,R., and Fritzler,M.J. 1996. The centromere kinesin-like protein, CENP-E. An autoantigen in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 39:1355-1361.
142. Sullivan,K.F., Hechenberger,M., and Masri,K. 1994. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J. Cell Biol.* 127:581-592.
143. Sugimoto,K., Muro,Y., and Himeno,M. 1992. Anti-helix-loop-helix domain antibodies: discovery of autoantibodies that inhibit DNA binding activity of human centromere protein B (CENP-B). *J. Biochem. (Tokyo)* 111:478-483.
144. Sugimoto,K., Kuriyama,K., Himeno,M., and Muro,Y. 1998. Epitope mapping of human centromere autoantigen centromere protein C (CENP-C); heterogeneity of anti-CENP-C response in rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 25:474-481.
145. Saitoh,H., Tomkiel,J., Cooke,C.A., Ratrie,H., III, Maurer,M., Rothfield,N.F., and Earnshaw,W.C. 1992. CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70:115-125.
146. Liao,H., Winkfein,R.J., Mack,G., Rattner,J.B., and Yen,T.J. 1995. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J. Cell Biol.* 130:507-518.
147. Moroi,Y., Peebles,C., Fritzler,M.J., Steigerwald,J., and Tan,E.M. 1980. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77:1627-1631.
148. Russo,K., Hoch,S., Dima,C., Varga,J., and Teodorescu,M. 2000. Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B antibodies in patients with diffuse and limited systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 27:142-148.
149. Tan,E.M., Smolen,J.S., McDougal,J.S., Butcher,B.T., Conn,D., Dawkins,R., Fritzler,M.J., Gordon,T., Hardin,J.A., Kalden,J.R. et al 1999. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum.* 42:455-464.
150. Vazquez-Abad,D., Wallace,S., Senecal,J.L., Joyal,F., Roussin,A., Earnshaw,W.C., and Rothfield,N. 1994. Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen. *Arthritis Rheum.* 37:248-252.
151. Sato,S., Fujimoto,M., Ihn,H., and Takehara,K. 1994. Antibodies to centromere and centriole in scleroderma spectrum disorders. *Dermatology.* 189:23-26.

152. Chan,H.L., Lee,Y.S., Hong,H.S., and Kuo,T.T. 1994. Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clin. Exp. Dermatol.* 19:298-302.
153. McHugh,N.J., Whyte,J., Artlett,C., Briggs,D.C., Stephens,C.O., Olsen,N.J., Gusseva,N.G., Maddison,P.J., Black,C.M., and Welsh,K. 1994. Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin. Exp. Immunol.* 96:267-274.
154. Kuwana,M., Kaburaki,J., Okano,Y., Tojo,T., and Homma,M. 1994. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 37:75-83.
155. Jacobsen,S., Halberg,P., Ullman,S., van Venrooij,W.J., Hoier-Madsen,M., Wiik,A., and Petersen,J. 1998. Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 Danish patients with systemic sclerosis. *Br. J. Rheumatol.* 37:39-45.
156. Weiner,E.S., Hildebrandt,S., Senecal,J.L., Daniels,L., Noell,S., Joyal,F., Roussin,A., Earnshaw,W., and Rothfield,N.F. 1991. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 34:68-77.
157. Tramposch,H.D., Smith,C.D., Senecal,J.L., and Rothfield,N. 1984. A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:121-124.
158. Vazquez-Abad,D., Russell,C.A., Cusick,S.M., Earnshaw,W.C., and Rothfield,N.F. 1995. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74:257-270.
159. Genth,E., Mierau,R., Genetzky,P., von Muhlen,C.A., Kaufmann,S., von,W.H., Meurer,M., Krieg,T., Pollmann,H.J., and Hartl,P.W. 1990. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 33:657-665.
160. Hirakata,M., Okano,Y., Pati,U., Suwa,A., Medsger,T.A., Jr., Hardin,J.A., and Craft,J. 1993. Identification of autoantibodies to RNA polymerase II. Occurrence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerases I and III. *J. Clin. Invest.* 91:2665-2672.
161. Okano,Y. 1996. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 22:709-735.
162. Chang,M., Wang,R.J., Yangco,D.T., Sharp,G.C., Komatireddy,G.R., and Hoffman,R.W. 1998. Analysis of autoantibodies against RNA polymerases using immunoaffinity-purified RNA polymerase I, II, and III antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 89:71-78.
163. Kuwana,M., Okano,Y., Pandey,J.P., Silver,R.M., Fertig,N., and Medsger,T.A., Jr. 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody: analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 52:2425-2432.
164. Reimer,G., Rose,K.M., Scheer,U., and Tan,E.M. 1987. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J. Clin. Invest.* 79:65-72.
165. Satoh,M., Ajmani,A.K., Ogasawara,T., Langdon,J.J., Hirakata,M., Wang,J., and Reeves,W.H. 1994. Autoantibodies to RNA polymerase II are common in systemic lupus

erythematosus and overlap syndrome. Specific recognition of the phosphorylated (HIO) form by a subset of human sera. *J. Clin. Invest.* 94:1981-1989.

166. Yamasaki,Y., Honkanen-Scott,M., Hernandez,L., Ikeda,K., Barker,T., Bubb,M.R., Narain,S., Richards,H.B., Chan,E.K., Reeves,W.H. et al 2006. Nucleolar staining cannot be used as a screening test for the scleroderma marker anti-RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum.* 54:3051-3056.
167. Fanning,G.C., Welsh,K.I., Bunn,C., Du,B.R., and Black,C.M. 1998. HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br. J. Rheumatol.* 37:201-207.
168. Harvey,G.R., Butts,S., Rands,A.L., Patel,Y., and McHugh,N.J. 1999. Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 117:395-402.
169. Falkner,D., Wilson,J., Fertig,N., Clawson,K., Medsger,T.A., Jr., and Morel,P.A. 2000. Studies of HLA-DR and DQ alleles in systemic sclerosis patients with autoantibodies to RNA polymerases and U3-RNP (fibrillarin). *J. Rheumatol.* 27:1196-1202.
170. Kuwana,M., Pandey,J.P., Silver,R.M., Kawakami,Y., and Kaburaki,J. 2003. HLA class II alleles in systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase I/III antibody: associations with subunit reactivities. *J. Rheumatol.* 30:2392-2397.
171. Harvey,G., Black,C., Maddison,P., and McHugh,N. 1997. Characterization of antinucleolar antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and their relatives. *J. Rheumatol.* 24:477-484.
172. Gunduz,O.H., Fertig,N., Lucas,M., and Medsger,T.A., Jr. 2001. Systemic sclerosis with renal crisis and pulmonary hypertension: a report of eleven cases. *Arthritis Rheum.* 44:1663-1666.
173. Maes,B., Van,M.A., Messiaen,T., Kuypers,D., Van,D.B., and Vanrenterghem,Y. 2000. Limited cutaneous systemic sclerosis associated with MPO-ANCA positive renal small vessel vasculitis of the microscopic polyangiitis type. *Am. J. Kidney Dis.* 36:E16.
174. Van,E.H., Vogelzangs,J.H., Bisschops,L., Te Boome,L.C., Seelig,H.P., Renz,M., de Rooij,D.J., Brouwer,R., Pluk,H., Pruijn,G.J. et al 2002. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clin. Exp. Immunol.* 130:532-540.
175. Bernstein,R.M., Steigerwald,J.C., and Tan,E.M. 1982. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 48:43-51.
176. Reddy,R., Tan,E.M., Henning,D., Nohga,K., and Busch,H. 1983. Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J. Biol. Chem.* 258:1383-1386.
177. Reichlin,M., Maddison,P.J., Targoff,I., Bunch,T., Arnett,F., Sharp,G., Treadwell,E., and Tan,E.M. 1984. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J. Clin. Immunol.* 4:40-44.
178. Cepeda,E.J., and Reveille,J.D. 2004. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16:723-732.

179. Brouwer,R., Vree Egberts,W.T., Hengstman,G.J., Raijmakers,R., van Engelen,B.G., Seelig,H.P., Renz,M., Mierau,R., Genth,E., Pruijn,G.J. et al 2002. Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Res.* 4:134-138.
180. Marguerie,C., Bunn,C.C., Copier,J., Bernstein,R.M., Gilroy,J.M., Black,C.M., So,A.K., and Walport,M.J. 1992. The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl. *Medicine (Baltimore)*. 71:327-336.
181. Jablonska,S., and Blaszczyk,M. 1999. Scleroderma overlap syndromes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 455:85-92.
182. Tormey,V.J., Bunn,C.C., Denton,C.P., and Black,C.M. 2001. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology. (Oxford)* 40:1157-1162.
183. Yimane,K., Ihn,H., Kubo,M., Asano,Y., Yazawa,N., and Tamaki,K. 2001. Anti-U3 snRNP antibodies in localised scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 60:1157-1158.
184. Ho,K.T., and Reveille,J.D. 2003. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res. Ther.* 5:80-93.
185. Sharp,G.C., Irvin,W.S., May,C.M., Holman,H.R., McDuffie,F.C., Hess,E.V., and Schmid,F.R. 1976. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systematic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154.
186. Lischwe,M.A., Smetana,K., Olson,M.O., and Busch,H. 1979. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci.* 25:701-708.
187. Savkur,R.S., and Olson,M.O. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 26:4508-4515.
188. Yung,B.Y., Busch,H., and Chan,P.K. 1985. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 826:167-173.
189. Schmidt-Zachmann,M.S., Hugle-Dorr,B., and Franke,W.W. 1987. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J.* 6:1881-1890.
190. Rodriguez-Sanchez,J.L., Gelpi,C., Juarez,C., and Hardin,J.A. 1987. Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J. Immunol.* 139:2579-2584.
191. Bell,S.P., Learned,R.M., Jantzen,H.M., and Tjian,R. 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science.* 241:1192-1197.
192. Jantzen,H.M., Chow,A.M., King,D.S., and Tjian,R. 1992. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev.* 6:1950-1963.
193. Imai,H., Ochs,R.L., Kiyosawa,K., Furuta,S., Nakamura,R.M., and Tan,E.M. 1992. Nucleolar antigens and autoantibodies in hepatocellular carcinoma and other malignancies. *Am. J. Pathol.* 140:859-870.

194. Imai,H., Fritzler,M.J., Neri,R., Bombardieri,S., Tan,E.M., and Chan,E.K. 1994. Immunocytochemical characterization of human NOR-90 (upstream binding factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera. Two MR forms of NOR-90/hUBF autoantigens. *Mol. Biol. Rep.* 19:115-124.
195. Dick,T., Mierau,R., Sternfeld,R., Weiner,E.M., and Genth,E. 1995. Clinical relevance and HLA association of autoantibodies against the nucleolus organizer region (NOR-90). *J. Rheumatol.* 22:67-72.
196. Fujii,T., Mimori,T., and Akizuki,M. 1996. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. *Arthritis Rheum.* 39:1313-1318.
197. Fritzler,M.J., von Muhlen,C.A., Toffoli,S.M., Staub,H.L., and Laxer,R.M. 1995. Autoantibodies to the nucleolar organizer antigen NOR-90 in children with systemic rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 22:521-524.
198. Ihn,H., Sato,S., Fujimoto,M., Igarashi,A., Yazawa,N., Kubo,M., Kikuchi,K., Takehara,K., and Tamaki,K. 2000. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* 119:203-209.
199. Negi,V.S., Tripathy,N.K., Misra,R., and Nityanand,S. 1998. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J. Rheumatol.* 25:462-466.
200. Salojin,K.V., Le,T.M., Saraux,A., Nassonov,E.L., Dueymes,M., Piette,J.C., and Youinou,P.Y. 1997. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am. J. Med.* 102:178-185.
201. Wusirika,R., Ferri,C., Marin,M., Knight,D.A., Waldman,W.J., Ross,P., Jr., and Magro,C.M. 2003. The assessment of anti-endothelial cell antibodies in scleroderma-associated pulmonary fibrosis. A study of indirect immunofluorescent and western blot analysis in 49 patients with scleroderma. *Am. J. Clin. Pathol.* 120:596-606.
202. Hill,M.B., Phipps,J.L., Cartwright,R.J., Milford,W.A., Greaves,M., and Hughes,P. 1996. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin. Exp. Immunol.* 106:491-497.
203. Carvalho,D., Savage,C.O., Black,C.M., and Pearson,J.D. 1996. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97:111-119.
204. Bordron,A., Dueymes,M., Levy,Y., Jamin,C., Leroy,J.P., Piette,J.C., Shoenfeld,Y., and Youinou,P.Y. 1998. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J. Clin. Invest* 101:2029-2035.
205. Sgonc,R., Gruschwitz,M.S., Dietrich,H., Recheis,H., Gershwin,M.E., and Wick,G. 1996. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest* 98:785-792.
206. Tamby,M.C., Humbert,M., Guilpain,P., Servettaz,A., Dupin,N., Christner,J.J., Simonneau,G., Fermanian,J., Weill,B., Guillevin,L. et al 2006. Antibodies to fibroblasts

in idiopathic and scleroderma associated pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 28:799-807.

207. Mimori,T., Akizuki,M., Yamagata,H., Inada,S., Yoshida,S., and Homma,M. 1981. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68:611-620.
208. Franceschini,F., Cavazzana,I., Generali,D., Quinzanini,M., Viardi,L., Ghirardello,A., Doria,A., and Cattaneo,R. 2002. Anti-Ku antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J. Rheumatol.* 29:1393-1397.
209. Isern,R.A., Yaneva,M., Weiner,E., Parke,A., Rothfield,N., Dantzker,D., Rich,S., and Arnett,F.C. 1992. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am. J. Med.* 93:307-312.
210. Takeda,Y., and Dynan,W.S. 2001. Autoantibodies against DNA double-strand break repair proteins. *Front Biosci.* 6:D1412-22.
211. Murai,C., Saito,S., Kasturi,K.N., and Bona,C.A. 1998. Spontaneous occurrence of anti-fibrillin-1 autoantibodies in tight-skin mice. *Autoimmunity.* 28:151-155.
212. Tan,F.K., Arnett,F.C., Antohi,S., Saito,S., Mirarchi,A., Spiera,H., Sasaki,T., Shoichi,O., Takeuchi,K., Pandey,J.P. et al 1999. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *J. Immunol.* 163:1066-1072.
213. Riente,L., Marchini,B., Dolcher,M.P., Puccetti,A., Bombardieri,S., and Migliorini,P. 1995. Anti-collagen antibodies in systemic sclerosis and in primary Raynaud's phenomenon. *Clin. Exp. Immunol.* 102:354-359.
214. Mackel,A.M., DeLustro,F., Harper,F.E., and LeRoy,E.C. 1982. Antibodies to collagen in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 25:522-531.
215. Lunardi,C., Bason,C., Navone,R., Millo,E., Damonte,G., Corrocher,R., and Puccetti,A. 2000. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat. Med.* 6:1183-1186.
216. Muryoi,T., Kasturi,K.N., Kafina,M.J., Cram,D.S., Harrison,L.C., Sasaki,T., and Bona,C.A. 1992. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J. Exp. Med.* 175:1103-1109.
217. Maul,G.G., Jimenez,S.A., Riggs,E., and Ziemnicka-Kotula,D. 1989. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:8492-8496.
218. Kasturi,K.N., Hatakeyama,A., Spiera,H., and Bona,C.A. 1995. Antifibrillarin autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes. *J. Exp. Med.* 181:1027-1036.
219. Fleischmajer,R., and Perlish,J.S. 1980. Capillary alterations in scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2:161-170.

220. Worda,M., Sgonc,R., Dietrich,H., Niederegger,H., Sundick,R.S., Gershwin,M.E., and Wick,G. 2003. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum.* 48:2605-2614.
221. Ramirez-Sandoval,R., Sanchez-Rodriguez,S.H., Herrera-van,O.D., valos-Diaz,E., and Herrera-Esparza,R. 2003. Antinuclear antibodies recognize cellular autoantigens driven by apoptosis. *Joint Bone Spine* 70:187-194.
222. Samejima,K., Svingen,P.A., Basi,G.S., Kottke,T., Mesner,P.W., Jr., Stewart,L., Durrieu,F., Poirier,G.G., Alnemri,E.S., Champoux,J.J. et al 1999. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:4335-4340.
223. Casiano,C.A., Ochs,R.L., and Tan,E.M. 1998. Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes. *Cell Death. Differ.* 5:183-190.
224. Schachna,L., Wigley,F.M., Morris,S., Gelber,A.C., Rosen,A., and Casciola-Rosen,L. 2002. Recognition of Granzyme B-generated autoantigen fragments in scleroderma patients with ischemic digital loss. *Arthritis Rheum.* 46:1873-1884.
225. Ulanet,D.B., Flavahan,N.A., Casciola-Rosen,L., and Rosen,A. 2004. Selective cleavage of nucleolar autoantigen B23 by granzyme B in differentiated vascular smooth muscle cells: insights into the association of specific autoantibodies with distinct disease phenotypes. *Arthritis Rheum.* 50:233-241.
226. Oriss,T.B., Hu,P.Q., and Wright,T.M. 2001. Distinct autoreactive T cell responses to native and fragmented DNA topoisomerase I: influence of APC type and IL-2. *J. Immunol.* 166:5456-5463.
227. Pollard,K.M., Pearson,D.L., Bluthner,M., and Tan,E.M. 2000. Proteolytic cleavage of a self-antigen following xenobiotic-induced cell death produces a fragment with novel immunogenic properties. *J. Immunol.* 165:2263-2270.
228. Herrera-vanOostdam,D.A., Esparza-Ibarra,E., Ramirez-Sandoval,R., Ortiz,V., Goitia,J.J., valos-Diaz,E., and Herrera-Esparza,R. 2004. Apoptosis and necrosis increase antigenicity of proteins recognized by antinuclear antibodies. *Reumatismo.* 56:156-161.
229. Casciola-Rosen,L.A., Anhalt,G., and Rosen,A. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179:1317-1330.
230. Frisoni,L., McPhie,L., Colonna,L., Sriram,U., Monestier,M., Gallucci,S., and Caricchio,R. 2005. Nuclear autoantigen translocation and autoantibody opsonization lead to increased dendritic cell phagocytosis and presentation of nuclear antigens: a novel pathogenic pathway for autoimmunity? *J. Immunol.* 175:2692-2701.
231. McArthur,C., Wang,Y., Veno,P., Zhang,J., and Fiorella,R. 2002. Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B (La), poly(ADP-ribose) polymerase and alpha-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-alpha. *Arch. Oral Biol.* 47:443-448.

232. Miranda,M.E., Tseng,C.E., Rashbaum,W., Ochs,R.L., Casiano,C.A., Di,D.F., Chan,E.K., and Buyon,J.P. 1998. Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *J. Immunol.* 161:5061-5069.
233. Neufing,P.J., Clancy,R.M., Jackson,M.W., Tran,H.B., Buyon,J.P., and Gordon,T.P. 2005. Exposure and binding of selected immunodominant La/SSB epitopes on human apoptotic cells. *Arthritis Rheum.* 52:3934-3942.
234. Ohlsson,M., Jonsson,R., and Brokstad,K.A. 2002. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Scand. J. Immunol.* 56:456-469.
235. Macdonald,P., Palmer,J., Kirby,J.A., and Jones,D.E. 2004. Apoptosis as a mechanism for cell surface expression of the autoantigen pyruvate dehydrogenase complex. *Clin. Exp. Immunol.* 136:559-567.
236. Casciola-Rosen,L., Wigley,F., and Rosen,A. 1997. Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J. Exp. Med.* 185:71-79.
237. Sato,S., Hasegawa,M., Fujimoto,M., Tedder,T.F., and Takehara,K. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J. Immunol.* 165:6635-6643.
238. Henault,J., Robitaille,G., Senecal,J.L., and Raymond,Y. 2006. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 54:963-973.
239. Krysko,D.V., D'Herde,K., and Vandenabeele,P. 2006. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* 11:1709-1726.
240. Radic,M., Marion,T., and Monestier,M. 2004. Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J. Immunol.* 172:6692-6700.
241. Wakasugi,K., and Schimmel,P. 1999. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 274:23155-23159.
242. Wu,X., Molinaro,C., Johnson,N., and Casiano,C.A. 2001. Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 44:2642-2652.
243. Howard,O.M., Dong,H.F., Yang,D., Raben,N., Nagaraju,K., Rosen,A., Casciola-Rosen,L., Hartlein,M., Kron,M., Yang,D. et al 2002. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196:781-791.
244. Howard,O.M., Dong,H.F., Su,S.B., Caspi,R.R., Chen,X., Plotz,P., and Oppenheim,J.J. 2005. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood.* 105:4207-4214.
245. Howard,O.Z. 2006. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18:642-646.

246. Oppenheim,J.J., Dong,H.F., Plotz,P., Caspi,R.R., Dykstra,M., Pierce,S., Martin,R., Carlos,C., Finn,O., Koul,O. et al 2005. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J. Leukoc. Biol.* 77:854-861.
247. Hengstman,G.J., van Engelen,B.G., Vree Egberts,W.T., and van Venrooij,W.J. 2001. Myositis-specific autoantibodies: overview and recent developments. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13:476-482.
248. Saito,Y., and Ishikawa,H. 1976. Ultrastructure of the microvasculature in skin affected by systemic scleroderma. *J. Dermatol.* 3:127-133.
249. Blann,A.D., Illingworth,K., and Jayson,M.I. 1993. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J. Rheumatol.* 20:1325-1330.
250. Kahaleh,M.B., Osborn,I., and LeRoy,E.C. 1981. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann. Intern. Med.* 94:482-484.
251. Ohdama,S., Takano,S., Miyake,S., Kubota,T., Sato,K., and Aoki,N. 1994. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 101:109-113.
252. Matucci-Cerinic,M., Jaffa,A., and Kahaleh,B. 1992. Angiotensin converting enzyme: an in vivo and in vitro marker of endothelial injury. *J. Lab Clin. Med.* 120:428-433.
253. Kahaleh,M.B. 1991. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum.* 34:978-983.
254. Yamane,K., Miyauchi,T., Suzuki,N., Yuhara,T., Akama,T., Suzuki,H., and Kashiwagi,H. 1992. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 19:1566-1571.
255. Del,P.N., Conforti,G., Gambini,D., La,R.L., Tincani,A., D'Cruz,D., Khamashta,M., Hughes,G.R., Balestrieri,G., and Meroni,P.L. 1994. Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70:211-216.
256. Marks,R.M., Czerniecki,M., Andrews,B.S., and Penny,R. 1988. The effects of scleroderma serum on human microvascular endothelial cells. Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Arthritis Rheum.* 31:1524-1534.
257. Kahaleh,M.B., and Fan,P.S. 1997. Mechanism of serum-mediated endothelial injury in scleroderma: identification of a granular enzyme in scleroderma skin and sera. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:32-40.
258. Sgonc,R. 1999. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120:169-176.
259. Jimenez,S.A., and Derk,C.T. 2004. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* 140:37-50.
260. Fleischmajer,R., Perlish,J.S., and Reeves,J.R. 1977. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 20:975-984.

261. Jimenez, S.A. 1983. Cellular immune dysfunction and the pathogenesis of scleroderma. *Semin. Arthritis Rheum.* 13:104-113.
262. Kraling, B.M., Maul, G.G., and Jimenez, S.A. 1995. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 63:48-56.
263. Ishikawa, O., and Ishikawa, H. 1992. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 19:1202-1206.
264. Roumm, A.D., Whiteside, T.L., Medsger, T.A., Jr., and Rodnan, G.P. 1984. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 27:645-653.
265. Ferrarini, M., Steen, V., Medsger, T.A., Jr., and Whiteside, T.L. 1990. Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 79:346-352.
266. Yurovsky, V.V., Wigley, F.M., Wise, R.A., and White, B. 1996. Skewing of the CD8⁺ T-cell repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum. Immunol.* 48:84-97.
267. Sakkas, L.I., Xu, B., Artlett, C.M., Lu, S., Jimenez, S.A., and Platsoucas, C.D. 2002. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Immunol.* 168:3649-3659.
268. Hu, P.Q., Oppenheim, J.J., Medsger, T.A., Jr., and Wright, T.M. 2006. T cell lines from systemic sclerosis patients and healthy controls recognize multiple epitopes on DNA topoisomerase I. *J. Autoimmun.* 26:258-267.
269. Atamas, S.P., and White, B. 2003. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:772-777.
270. Atamas, S.P., and White, B. 2003. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:537-550.
271. Sakkas, L.I., and Platsoucas, C.D. 2004. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 50:1721-1733.
272. Luzina, I.G., Atamas, S.P., Wise, R., Wigley, F.M., Choi, J., Xiao, H.Q., and White, B. 2003. Occurrence of an activated, profibrotic pattern of gene expression in lung CD8⁺ T cells from scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 48:2262-2274.
273. Kahari, V.M., Sandberg, M., Kalimo, H., Vuorio, T., and Vuorio, E. 1988. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J. Invest Dermatol.* 90:664-670.
274. Scharffetter, K., Lankat-Buttgereit, B., and Krieg, T. 1988. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *Eur. J. Clin. Invest* 18:9-17.
275. Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Takehara, K., and Tedder, T.F. 2004. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol. Immunol.* 41:1123-1133.

276. Sato,S., Fujimoto,M., Hasegawa,M., and Takehara,K. 2004. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 50:1918-1927.
277. Famularo,G., Giacomelli,R., Alesse,E., Cifone,M.G., Morrone,S., Boirivant,M., Danese,C., Perego,M.A., Santoni,A., and Toniatti,G. 1989. Polyclonal B lymphocyte activation in progressive systemic sclerosis. *J. Clin. Lab Immunol.* 29:59-63.
278. Tedder,T.F., Inaoki,M., and Sato,S. 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity.* 6:107-118.
279. Kuwana,M., Medsger,T.A., Jr., and Wright,T.M. 1995. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J. Immunol.* 155:2703-2714.
280. Hasegawa,M., Fujimoto,M., Takehara,K., and Sato,S. 2005. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J. Dermatol. Sci.* 39:1-7.
281. Hasegawa,M., Hamaguchi,Y., Yanaba,K., Bouaziz,J.D., Uchida,J., Fujimoto,M., Matsushita,T., Matsushita,Y., Horikawa,M., Komura,K. et al 2006. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* 169:954-966.
282. Varga,J., and Bashey,R.I. 1995. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 12:187-199.
283. Fleischmajer,R., Damiano,V., and Nedwich,A. 1971. Scleroderma and the subcutaneous tissue. *Science* 171:1019-1021.
284. Kuroda,K., and Shinkai,H. 1997. Decorin and glycosaminoglycan synthesis in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch. Dermatol. Res.* 289:481-485.
285. Eckes,B., Mauch,C., Huppe,G., and Krieg,T. 1996. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem. J.* 315 (Pt 2):549-554.
286. Fleischmajer,R., Jacobs,L., Schwartz,E., and Sakai,L.Y. 1991. Extracellular microfibrils are increased in localized and systemic scleroderma skin. *Lab Invest* 64:791-798.
287. Gerstmeier,H., Gabrielli,A., Meurer,M., Brocks,D., Braun-Falco,O., and Krieg,T. 1988. Levels of type IV collagen and laminin fragments in serum from patients with progressive systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 15:969-972.
288. Westergren-Thorsson,G., Coster,L., Akesson,A., and Wollheim,F.A. 1996. Altered dermatan sulfate proteoglycan synthesis in fibroblast cultures established from skin of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 23:1398-1406.
289. Salmon-Ehr,V., Serpier,H., Nawrocki,B., Gillery,P., Clavel,C., Kalis,B., Birembaut,P., and Maquart,F.X. 1996. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch. Dermatol.* 132:802-806.

290. Higley,H., Persichitte,K., Chu,S., Waegell,W., Vancheeswaran,R., and Black,C. 1994. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 37:278-288.
291. Igarashi,A., Nashiro,K., Kikuchi,K., Sato,S., Ihn,H., Grotendorst,G.R., and Takehara,K. 1995. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J. Invest Dermatol.* 105:280-284.
292. Igarashi,A., Nashiro,K., Kikuchi,K., Sato,S., Ihn,H., Fujimoto,M., Grotendorst,G.R., and Takehara,K. 1996. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J. Invest Dermatol.* 106:729-733.
293. Postlethwaite,A.E., Holness,M.A., Katai,H., and Raghow,R. 1992. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J. Clin. Invest* 90:1479-1485.
294. Postlethwaite,A.E. 1995. Role of T cells and cytokines in effecting fibrosis. *Int. Rev. Immunol.* 12:247-258.
295. Tamby,M.C., Chanseaud,Y., Guillevin,L., and Mouthon,L. 2003. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2:152-157.
296. Desmouliere,A., Geinoz,A., Gabbiani,F., and Gabbiani,G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122:103-111.
297. Jelaska,A., and Korn,J.H. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43:2230-2239.
298. Kirk,T.Z., Mark,M.E., Chua,C.C., Chua,B.H., and Mayes,M.D. 1995. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J. Biol. Chem.* 270:3423-3428.
299. Jelaska,A., Arakawa,M., Broketa,G., and Korn,J.H. 1996. Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 39:1338-1346.
300. Leask,A., and Abraham,D.J. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18:816-827.
301. Leask,A., Holmes,A., and Abraham,D.J. 2002. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 4:136-142.
302. Moustakas,A., Souchelnytskyi,S., and Heldin,C.H. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J. Cell Sci.* 114:4359-4369.
303. Heldin,C.H., Miyazono,K., and ten,D.P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.

304. Ihn,H., Yamane,K., Kubo,M., and Tamaki,K. 2001. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum.* 44:474-480.
305. Ihn,H., and Tamaki,K. 2000. Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of the type I collagen gene. *Arthritis Rheum.* 43:2240-2247.
306. Dong,C., Zhu,S., Wang,T., Yoon,W., Li,Z., Alvarez,R.J., ten,D.P., White,B., Wigley,F.M., and Goldschmidt-Clermont,P.J. 2002. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3908-3913.
307. Asano,Y., Ihn,H., Yamane,K., Jinnin,M., Mimura,Y., and Tamaki,K. 2005. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Immunol.* 175:7708-7718.
308. Asano,Y., Ihn,H., Yamane,K., Jinnin,M., and Tamaki,K. 2006. Increased expression of integrin alphavbeta5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 168:499-510.
309. Takeda,K., Hatamochi,A., Ueki,H., Nakata,M., and Oishi,Y. 1994. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 103:359-363.
310. Kikuchi,K., Kadono,T., Furue,M., and Tamaki,K. 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 108:281-284.
311. Denton,C.P., Xu,S., Black,C.M., and Pearson,J.D. 1997. Scleroderma fibroblasts show increased responsiveness to endothelial cell-derived IL-1 and bFGF. *J. Invest Dermatol.* 108:269-274.
312. Chizzolini,C., Rezzonico,R., Ribbens,C., Burger,D., Wollheim,F.A., and Dayer,J.M. 1998. Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 41:2039-2047.
313. Strehlow,D., and Korn,J.H. 1998. Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10:572-578.
314. Claman,H.N., Giorno,R.C., and Seibold,J.R. 1991. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin". *Arthritis Rheum.* 34:1495-1501.
315. Hildebrandt,S., Jackh,G., Weber,S., and Peter,H.H. 1993. A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies. *Rheumatol. Int.* 12:231-234.
316. Senecal,J.L., Ichiki,S., Girard,D., and Raymond,Y. 1993. Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins: natural, pathologic or pathogenic? *J. Rheumatol.* 20:211-219.
317. Spatz,L., Iliev,A., Saenko,V., Jones,L., Irigoyen,M., Manheimer-Lory,A., Gaynor,B., Putterman,C., Bynoe,M., Kowal,C. et al 1997. Studies on the structure, regulation, and pathogenic potential of anti-dsDNA antibodies. *Methods.* 11:70-78.

318. Putterman,C., and Diamond,B. 1998. Immunization with a peptide surrogate for double-stranded DNA (dsDNA) induces autoantibody production and renal immunoglobulin deposition. *J. Exp. Med.* 188:29-38.
319. Suzuki,N., Mihara,S., and Sakane,T. 1997. Development of pathogenic anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *FASEB J.* 11:1033-1038.
320. Harris,M.L., and Rosen,A. 2003. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:778-784.
321. Gussin,H.A., Ignat,G.P., Varga,J., and Teodorescu,M. 2001. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44:376-383.
322. Respaldiza,N., Wichmann,I., Ocana,C., Garcia-Hernandez,F.J., Castillo,M.J., Magarino,M.I., Magarino,R., Torres,A., Sanchez-Roman,J., and Nunez-Roldan,A. 2006. Anti-centromere antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol.* 35:290-294.
323. Giordano,M., Valentini,G., Migliaresi,S., Picillo,U., and Vatti,M. 1986. Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J. Rheumatol.* 13:911-916.
324. Kuwana,M., Okano,Y., Kaburaki,J., Tojo,T., and Medsger,T.A., Jr. 1994. Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 37:902-906.
325. Kuwana,M., Kaburaki,J., Arnett,F.C., Howard,R.F., Medsger,T.A., Jr., and Wright,T.M. 1999. Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum.* 42:465-474.
326. Lonzetti,L.S., Joyal,F., Raynauld,J.P., Roussin,A., Goulet,J.R., Rich,E., Choquette,D., Raymond,Y., and Senecal,J.L. 2001. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum.* 44:735-736.
327. Asero,R., Banfi,G., Radelli,L., Origgi,L., Bertetti,E., Vanoli,M., and Riboldi,P. 1990. Relationship between antibodies to dsDNA and to soluble cellular antigens and histologically defined glomerulonephritis in patients with SLE. *Autoimmunity.* 7:13-21.
328. Clancy,R.M., Askanase,A.D., Kapur,R.P., Chiopelas,E., Azar,N., Miranda-Carus,M.E., and Buyon,J.P. 2002. Transdifferentiation of cardiac fibroblasts, a fetal factor in anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *J. Immunol.* 169:2156-2163.
329. Gerbracht,D.D., Steen,V.D., Ziegler,G.L., Medsger,T.A., Jr., and Rodnan,G.P. 1985. Evolution of primary Raynaud's phenomenon (Raynaud's disease) to connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 28:87-92.
330. Naparstek,Y., and Plotz,P.H. 1993. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.* 11:79-104.

331. Earnshaw,W.C., Machlin,P.S., Bordwell,B.J., Rothfield,N.F., and Cleveland,D.W. 1987. Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:4979-4983.
332. Eisenberg,R.A., Earnshaw,W.C., Bordwell,B.J., Craven,S.Y., Cheek,R., and Rothfield,N.F. 1989. Isotype analysis of the anti-CENP-B anticentromere autoantibody: evidence for restricted clonality. *Arthritis Rheum.* 32:1315-1318.
333. Mahler,M., Mierau,R., Genth,E., and Bluthner,M. 2002. Development of a CENP-A/CENP-B-specific immune response in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 46:1866-1872.
334. Plotz,P.H. 2003. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat. Rev. Immunol.* 3:73-78.
335. Vazquez-Abad,D., Monteon,V., Senecal,J.L., Walsh,S., and Rothfield,N. 1997. Analysis of IgG subclasses of human antitopoisomerase I autoantibodies suggests chronic B cell stimulation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84:65-72.
336. D'Arpa,P., Machlin,P.S., Ratric,H., III, Rothfield,N.F., Cleveland,D.W., and Earnshaw,W.C. 1988. cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2543-2547.
337. Cox,J.V., Schenk,E.A., and Olmsted,J.B. 1983. Human anticentromere antibodies: distribution, characterization of antigens, and effect on microtubule organization. *Cell.* 35:331-339.
338. Henault,J., Tremblay,M., Clement,I., Raymond,Y., and Senecal,J.L. 2004. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 50:3265-3274.
339. Nguyen,V.A., Sgonc,R., Dietrich,H., and Wick,G. 2000. Endothelial injury in internal organs of University of California at Davis line 200 (UCD 200) chickens, an animal model for systemic sclerosis (Scleroderma). *J. Autoimmun.* 14:143-149.
340. Hatakeyama,A., Kasturi,K.N., Wolf,I., Phelps,R.G., and Bona,C.A. 1996. Correlation between the concentration of serum anti-topoisomerase I autoantibodies and histological and biochemical alterations in the skin of tight skin mice. *Cell Immunol.* 167:135-140.
341. Kluger,N., Gati,S., Molinari,E., and Frances,C. 2005. Lung disease in systemic scleroderma. *Ann. Dermatol. Venereol.* 132:905-914.
342. Nishimura,H., Okazaki,T., Tanaka,Y., Nakatani,K., Hara,M., Matsumori,A., Sasayama,S., Mizoguchi,A., Hiai,H., Minato,N. et al 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* 291:319-322.
343. Muruyoi,T., Kasturi,K.N., Kafina,M.J., Saitoh,Y., Usuba,O., Perlish,J.S., Fleischmajer,R., and Bona,C.A. 1991. Self reactive repertoire of tight skin mouse: immunochemical and molecular characterization of anti-topoisomerase I autoantibodies. *Autoimmunity* 9:109-117.
344. Gentiletti,J., McCloskey,L.J., Artlett,C.M., Peters,J., Jimenez,S.A., and Christner,P.J. 2005. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J. Immunol.* 175:2418-2426.

345. Ruzek,M.C., Jha,S., Ledbetter,S., Richards,S.M., and Garman,R.D. 2004. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.* 50:1319-1331.
346. Siracusa,L.D., McGrath,R., Ma,Q., Moskow,J.J., Manne,J., Christner,P.J., Buchberg,A.M., and Jimenez,S.A. 1996. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* 6:300-313.
347. Wallace,V.A., Kondo,S., Kono,T., Xing,Z., Timms,E., Furlonger,C., Keystone,E., Gauldie,J., Sauder,D.N., Mak,T.W. et al 1994. A role for CD4+ T cells in the pathogenesis of skin fibrosis in tight skin mice. *Eur. J. Immunol.* 24:1463-1466.
348. Asano,N., Fujimoto,M., Yazawa,N., Shirasawa,S., Hasegawa,M., Okochi,H., Tamaki,K., Tedder,T.F., and Sato,S. 2004. B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am. J. Pathol.* 165:641-650.
349. Bocchieri,M.H., Henriksen,P.D., Kasturi,K.N., Muryoi,T., Bona,C.A., and Jimenez,S.A. 1991. Evidence for autoimmunity in the tight skin mouse model of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 34:599-605.
350. Christner,P.J., Peters,J., Hawkins,D., Siracusa,L.D., and Jimenez,S.A. 1995. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 38:1791-1798.
351. Sgonc,R., Dietrich,H., Sieberer,C., Wick,G., Christner,P.J., and Jimenez,S.A. 1999. Lack of endothelial cell apoptosis in the dermis of tight skin 1 and tight skin 2 mice. *Arthritis Rheum.* 42:581-584.
352. Zhang,Y., McCormick,L.L., Desai,S.R., Wu,C., and Gilliam,A.C. 2002. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J. Immunol.* 168:3088-3098.
353. Takamori,M., and Maruta,T. 2001. Immunoabsorption in myasthenia gravis based on specific ligands mimicking the immunogenic sites of the acetylcholine receptor. *Ther. Apher.* 5:340-350.
354. Wallukat,G., Muller,J., and Hetzer,R. 2002. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 347:1806.
355. Keil-Dlouha,V., V, Zylber,N., Imhoff,J., Tong,N., and Keil,B. 1971. Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Lett.* 16:291-295.
356. Klausner,R.D., Donaldson,J.G., and Lippincott-Schwartz,J. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116:1071-1080.
357. Simons,K., and van,M.G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27:6197-6202.
358. Brown,D.A., and Rose,J.K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533-544.
359. Simons,K., and Ikonen,E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-572.

360. Rodal,S.K., Skretting,G., Garred,O., Vilhardt,F., van,D.B., and Sandvig,K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 10:961-974.
361. Jacob,L., Viard,J.P., Allenet,B., Anin,M.F., Slama,F.B., Vandekerckhove,J., Primo,J., Markovits,J., Jacob,F., Bach,J.F. et al 1989. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:4669-4673.
362. Koutouzov,S., Cabrespines,A., Amoura,Z., Chabre,H., Lotton,C., and Bach,J.F. 1996. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies. *Eur. J. Immunol.* 26:472-486.
363. Koutouzov,S., Cabrespines,A., Amoura,Z., Chabre,H., Lotton,C., and Bach,J.F. 1996. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies. *Eur. J. Immunol.* 26:472-486.

Annexe I: Résultats supplémentaires de l'article #2.

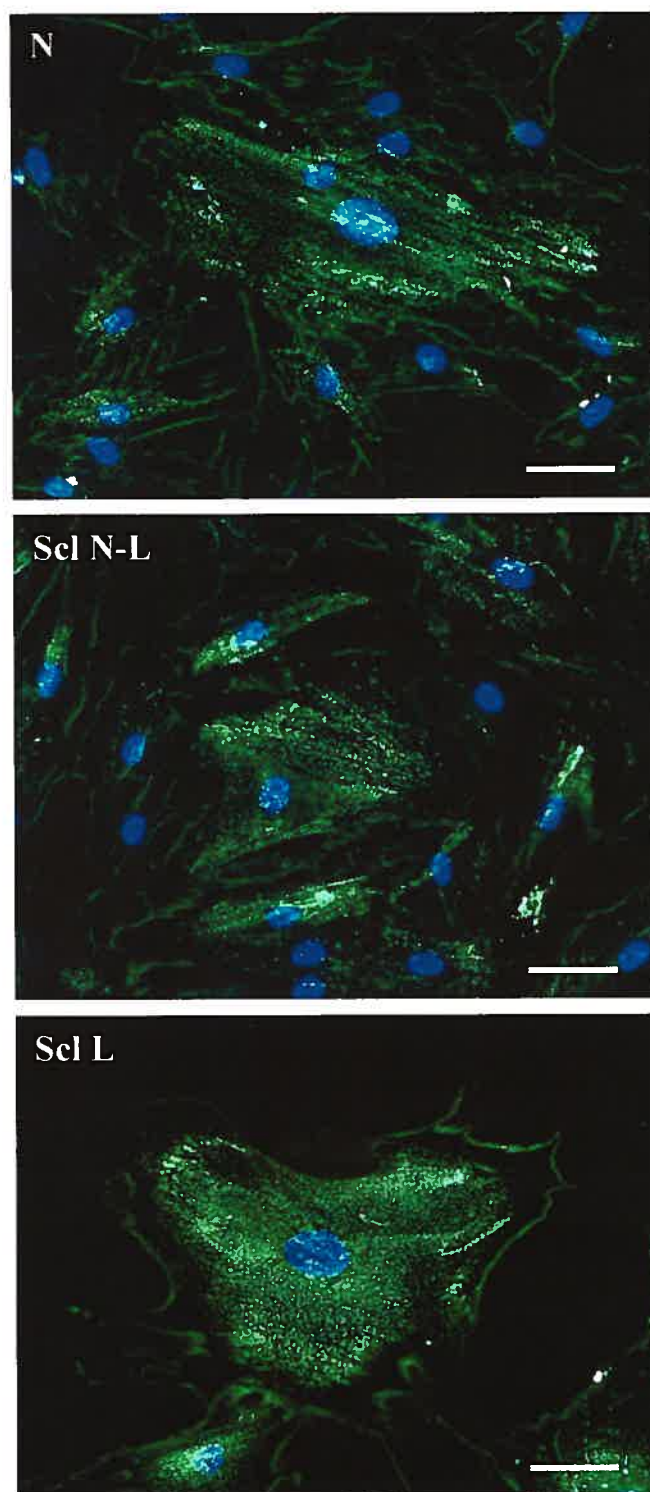


Figure A1. Étude par immunofluorescence indirecte du patron de liaison de la topo I à la surface des fibroblastes normaux et de patients sclérodermiques. Des fibroblastes

provenants de biopsies cutanées d'individus normaux ou de patients sclérodermiques furent incubés avec 0.5 µg/ml de topo I, puis avec des IgG purifiés à partir de séra de patients sclérodermiques positifs pour la présence d'anti-topo I. La liaison de la topo I à la surface des fibroblastes fut ensuite détectée avec un anti-IgG humain couplé à la fluorescéine isothiocyanate-5 (FITC, en vert). Le Hoechst 33342 fut utilisé pour la détection des noyaux (en bleu). Aucune différence significative ne fut observée entre les patrons de liaison de la topo I à la surface des fibroblastes normaux comparés aux fibroblastes de patients sclérodermiques. N = fibroblastes normaux, Scl N-L = fibroblastes sclérodermiques provenant de peau non-lésionnelle, Scl L = fibroblastes sclérodermiques provenant de peau lésionnelle. Bar = 10 µm.

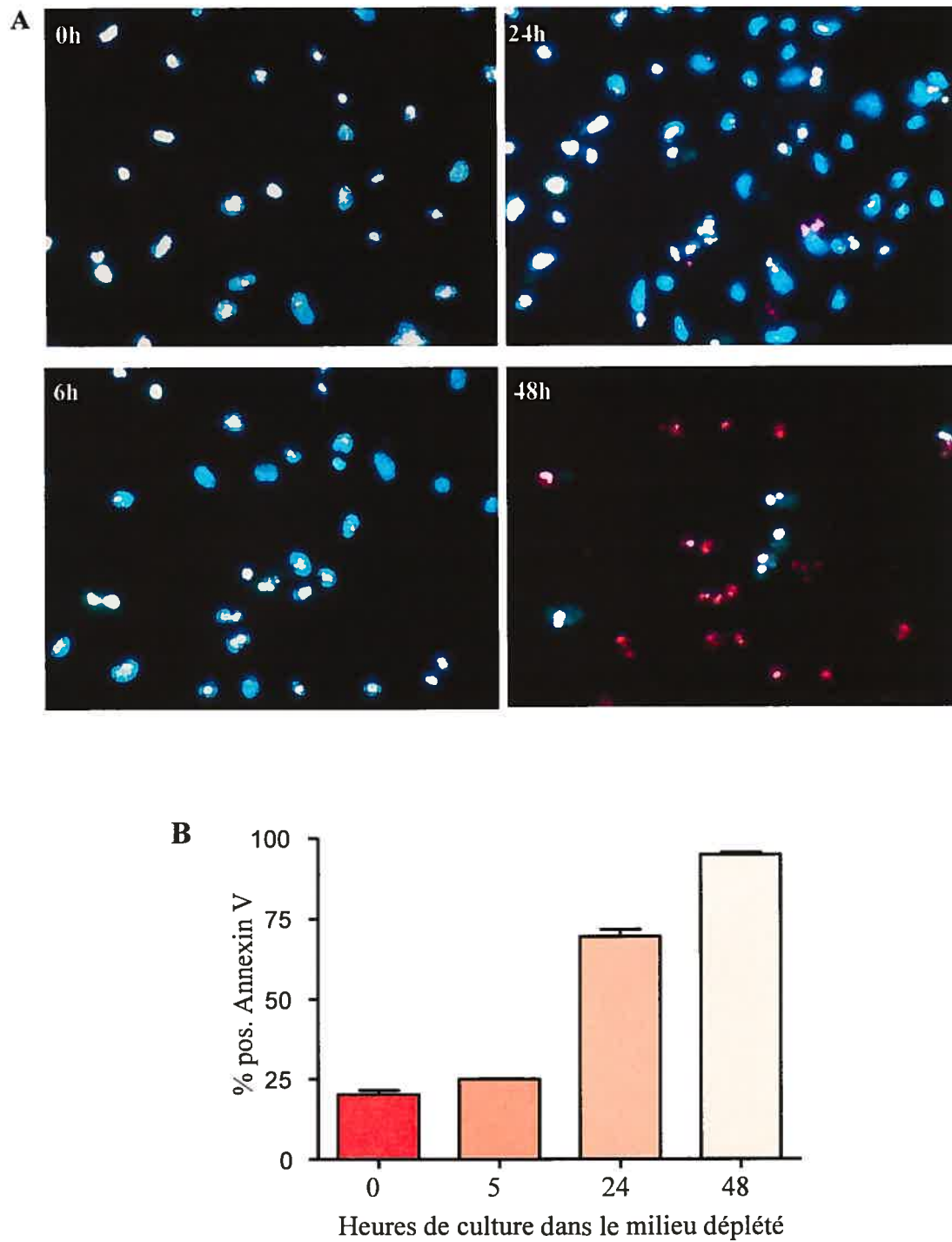
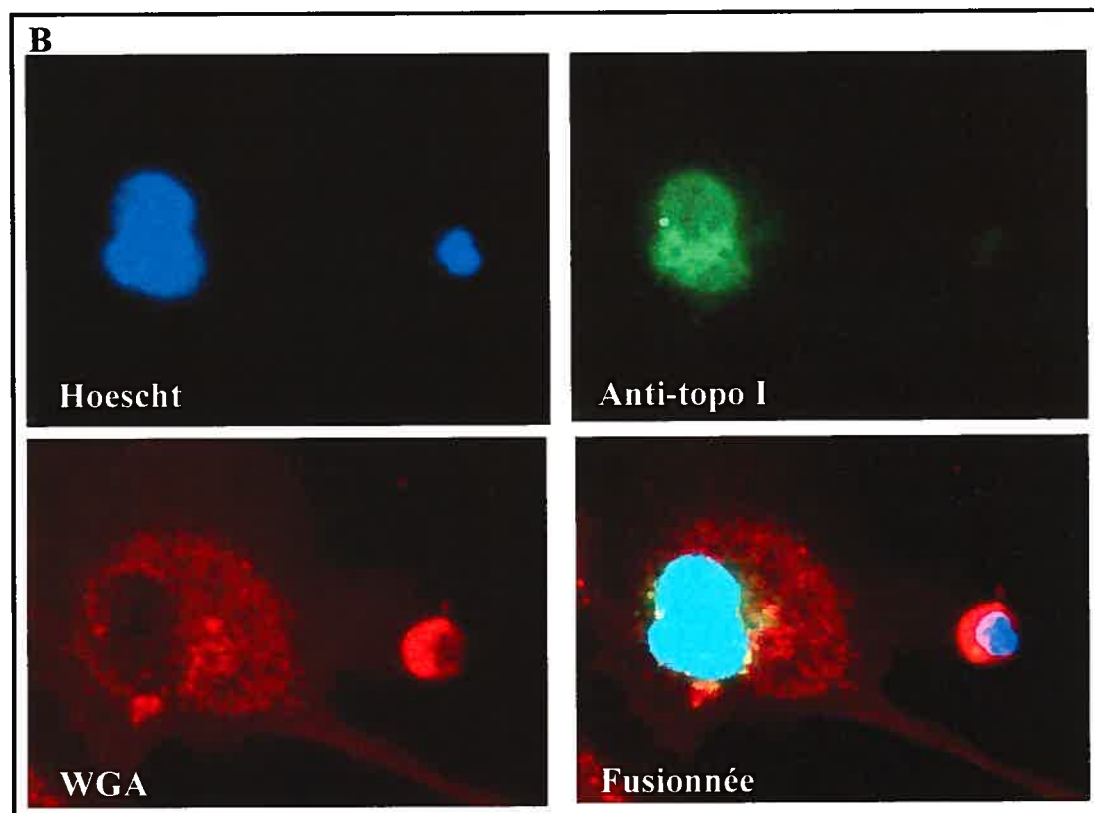
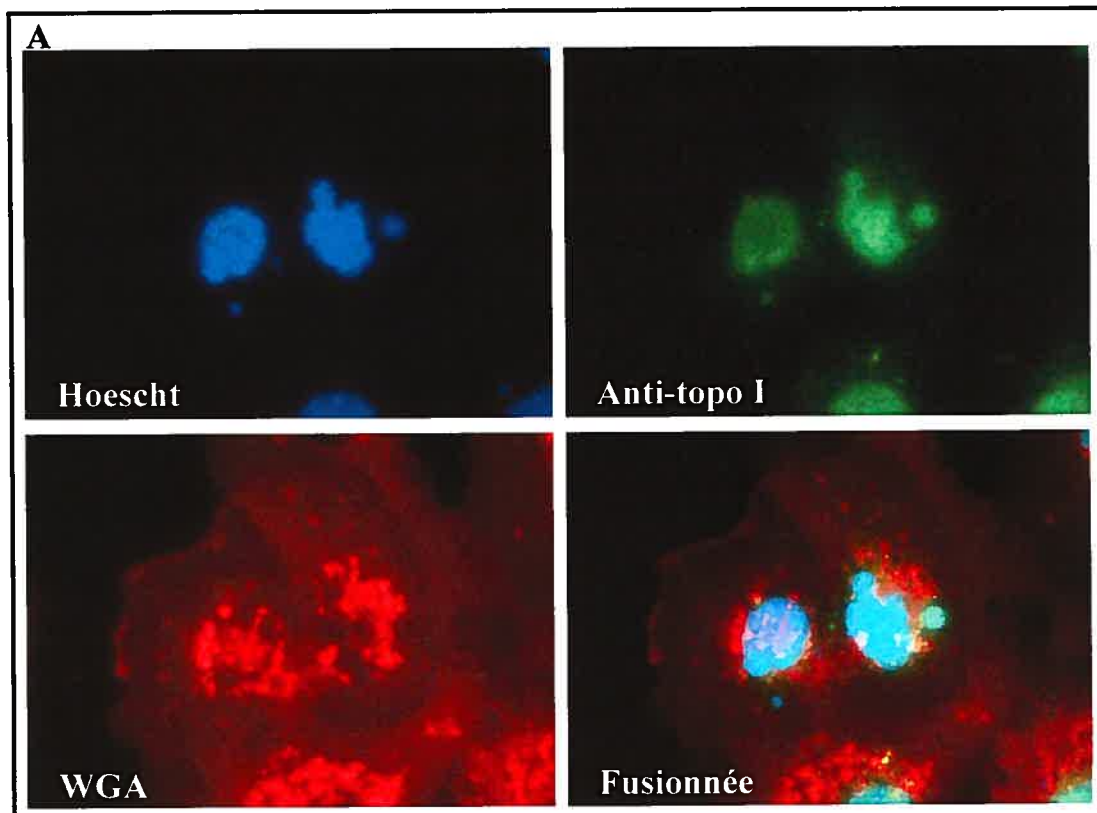


Figure A2. Induction de l'apoptose chez les HUVEC par déplétion de sérum. (A)

Détection de l'apoptose chez les HUVEC par la méthode Hoechst/PI. Des HUVEC

furent cultivées dans du milieu déplété en sérum pendant 0, 6, 24 ou 48 hres. Après 48 hres de culture dans le milieu déplété, environ 90 % des cellules sont apoptotiques.

Annexe II: Résultats supplémentaires



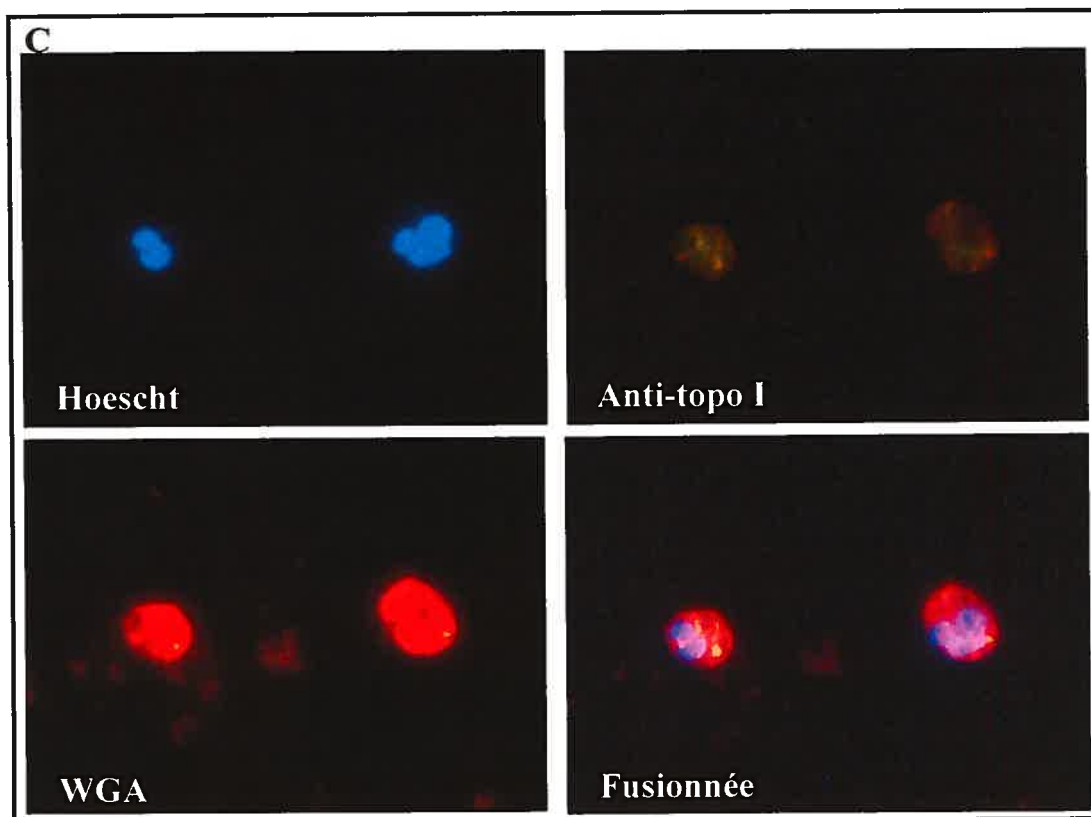
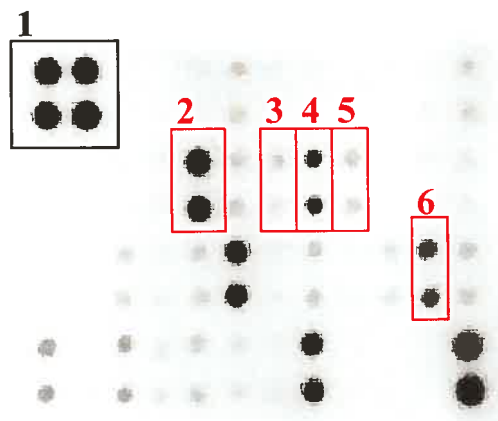


Figure A3. Localisation par immunofluorescence indirecte de la topo I dans les cellules endotheliales lors du processus d'apoptose. L'apoptose des cellules HUVEC fût induite par déplétion de sérum pendant 6, 24 ou 48 hrs. Les cellules furent ensuite fixées et perméabilisées avec du méthanol et de l'acétone. La topo I fût détectée avec des anti-topo I humains provenant de patients sclérodermiques et un anti-IgG humain couplé au FITC (en vert). Le Hoechst 33342 fut utilisé pour la détection de la chromatine (en bleu) et le «wheat germ agglutinin» (WGA) couplé à l'Alexa Fluor fût utilisé pour la détection des membranes cellulaires (en rouge). **(A)** HUVEC après 6 hrs de culture en milieu déplété : la chromatine commence à se condenser, les cellules demeurent attachées au substrat, la topo I colocalise avec la chromatine. **(B)** HUVEC après 24 hrs de culture en milieu déplété : la chromatine est condensée, les

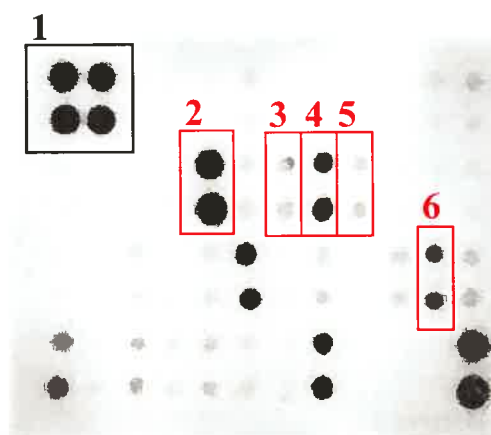
cellules s'arrondissent et commencent à se détacher du substrat, des corps apoptotiques contenant des fragments de chromatine apparaissent, la topo I colocalise avec la chromatine des noyaux mais non avec la chromatine des corps apoptotiques. (C) HUVEC après 48 hrs de culture en milieu déplété : les cellules se sont complètement détachées du substrat et ont dégénéré en corps apoptotiques contenant des fragments de chromatine, la topo I ne colocalise plus avec la chromatine.

A

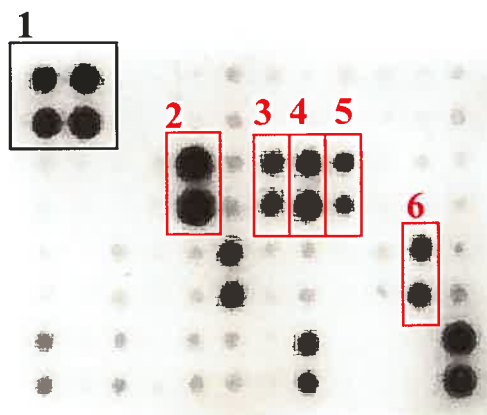
C-



Scl Ac
(anti-topo I -)



Scl Ac
(anti-topo I +)



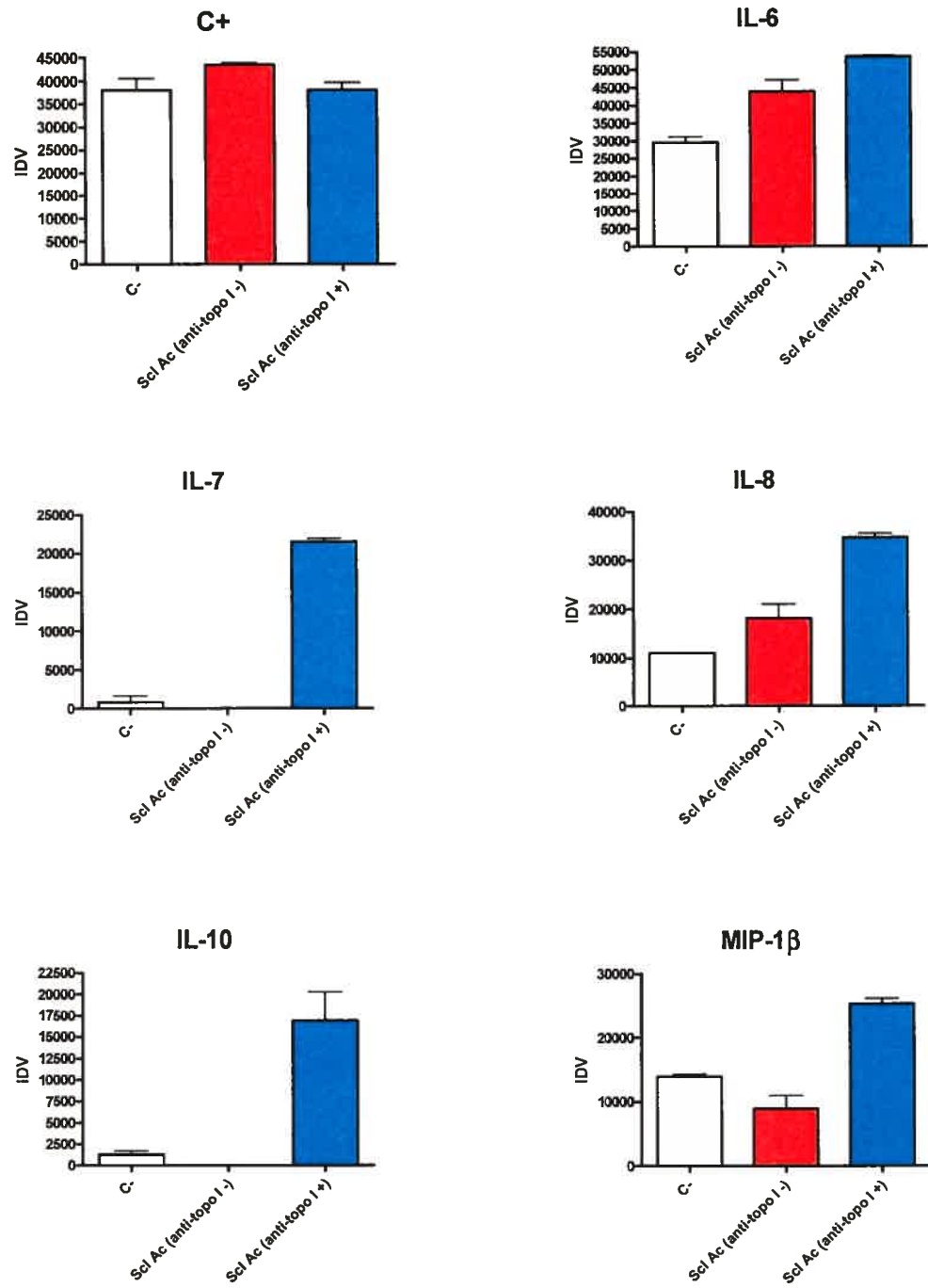
B

Figure A4. Étude par biopuce à protéines des cytokines exprimées par les monocytes en co-culture avec des fibroblastes exposés à de la topo I en présence d'anti-topo I. Des monocytes THP-1 furent mis en co-culture pendant 3 jours avec des NHLF préalablement incubés avec de la topo I (5 µg/ml) et des anti-topo I provenant de patients sclérodermiques (200 µg/ml). **(A)** Les cytokines présentes dans le surnageant de co-culture furent ensuite analysées par biopuce à protéines (RayBio Human Inflammation Antibody Array III, RayBiotech, Norcross, GA). Des différences d'expression furent notées pour les cytokines suivantes: 1. contrôle positif, 2. Il-6, 3. Il-7, 4. Il-8, 5. Il-10 et 6. MIP-1β. **(B)** Analyse de l'expression relative des cytokines dans les surnageants de co-culture. Les résultats sont exprimés en «integrated density values» (IDV). C- = co-culture en absence d'anticorps, Scl Ac (anti-topo -) = co-culture avec anticorps provenant d'un patient sclérodermique négatif pour l'expression d'anti-topo I, Scl Ac (anti-topo +) = co-culture avec anticorps provenant d'un patient sclérodermique positif pour l'expression d'anti-topo I.

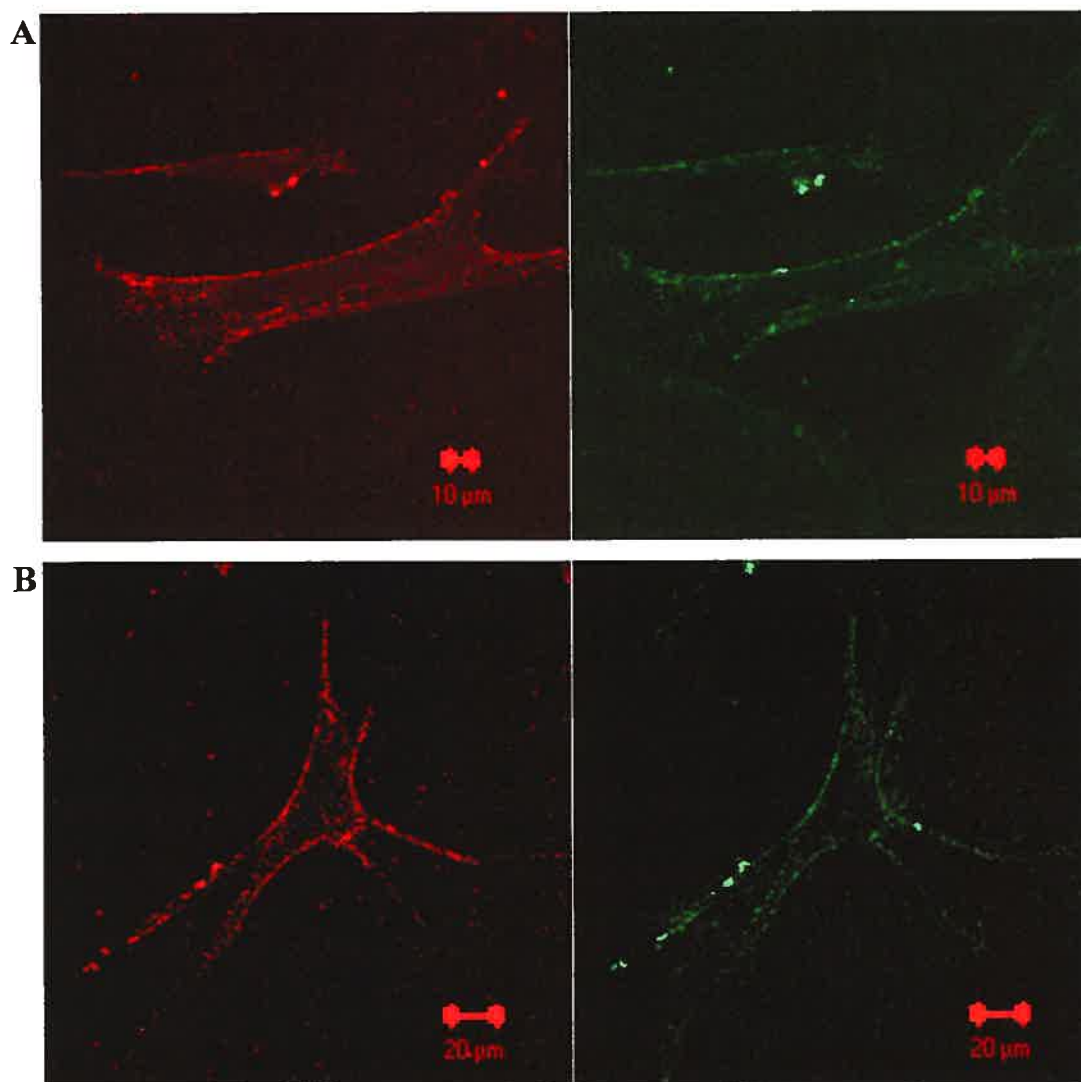


Figure A5. Étude par microscopie confocale de la liaison de la topo I sur les fibroblastes. Des fibroblastes humains vivants, non-fixés et non-perméabilisés, furent incubés avec de la topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$). La liaison de la topo I fût détectée avec un anti-topo I monoclonale de souris (en rouge) ainsi qu'avec des anti-topo I purifiés à partir de sera de patients sclérodermiques (en vert). **(A et B)** Deux exemples de liaison de la topo I sur un fibroblaste, vue en coupe transversale. La topo I est détectée exclusivement au niveau de la membrane cellulaire.

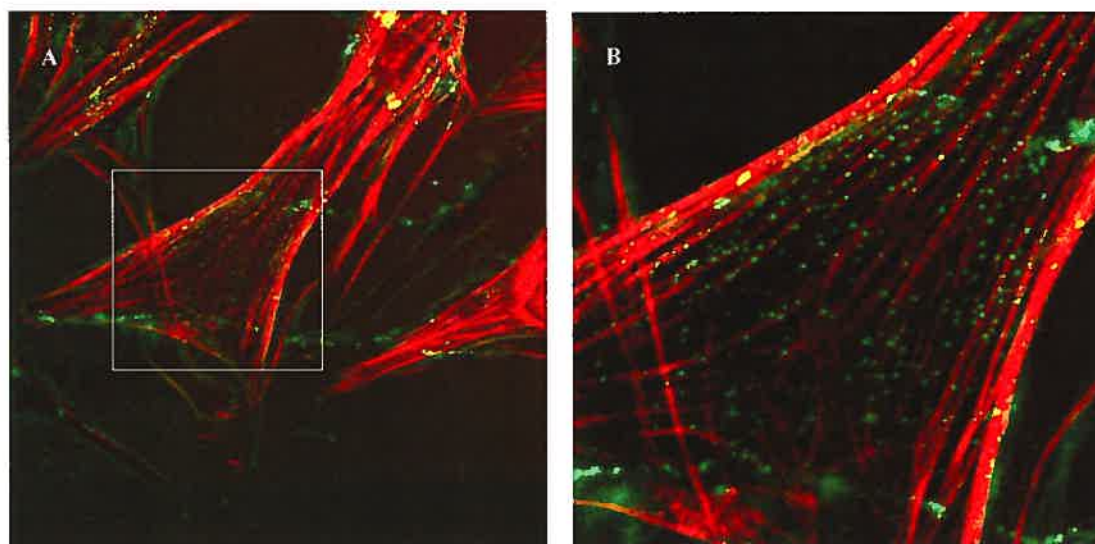


Figure A6. Étude par microscopie confocale du patron de liaison de la topo I à la surface des fibroblastes. Des fibroblastes humains furent incubés avec de la topo I (0.5 $\mu\text{g/ml}$). La liaison de la topo I à la surface des cellules fût détectée avec des anti-topo I provenant de patients sclérodermiques et un anti-IgG humain couplé au FITC, (en vert). Les fibres d'alpha-actine musculaire lisse (α -SMA) furent détectées avec un anticorps anti- α -SMA couplé à la rhodamine (en rouge). **(A)** Grossissement 200X. **(B)** Grossissement 400X de l'encadré de (A).

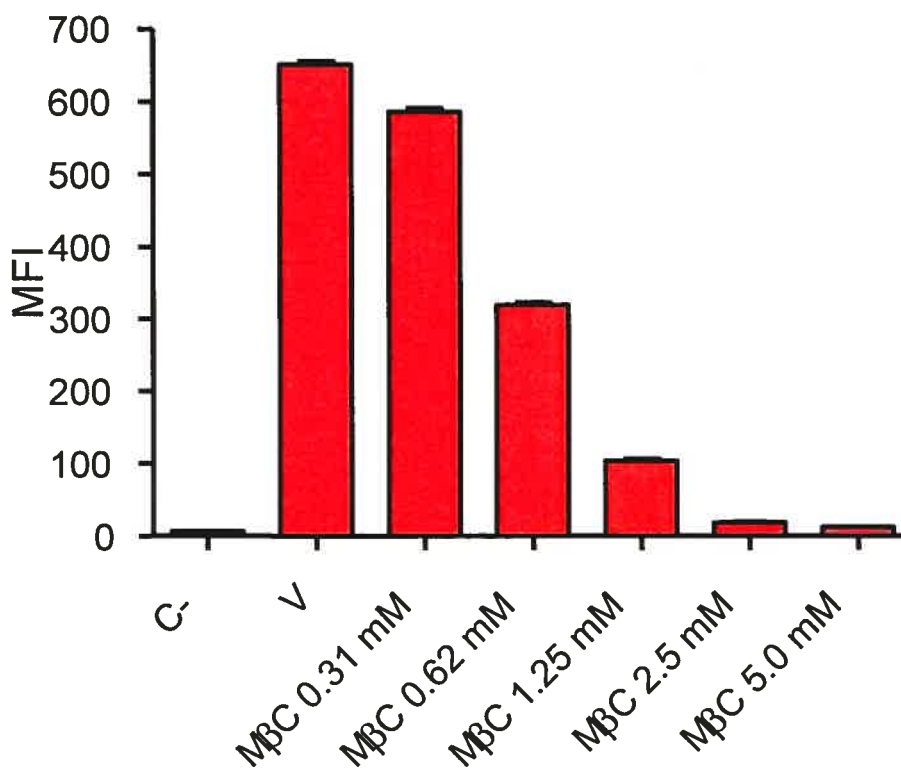


Figure A7. Étude par cytométrie en flux de l'effet de la méthyl-beta-cyclodextrine (MβC) sur la liaison de la topo I à la surface des fibroblastes. Des NHLF furent préincubés avec différentes concentrations de MβC ou avec le véhicule (PBS) pendant 1hre puis incubés avec de la topo I (1.0 µg/ml). La liaison de la topo I à la surface des fibroblastes fut détectée avec des anti-topo I provenant de patients sclérodermiques et un anti-IgG humain couplé au FITC. La MβC inhibe de façon dose-dépendante la liaison de la topo I à la surface des fibroblastes. C- = anti-IgG humain seul, V = véhicule (PBS)

